

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**“SÍNTESIS DE UN BIODIESEL DE 1.5 GENERACIÓN A PARTIR
DE MICROALGAS NATIVAS DEL NORESTE DE MÉXICO,
INTEGRANDO TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES”**

Por

MC JESSICA COSSETTE CANINO GÓMEZ

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN
CIENCIAS con Orientación en Procesos Sustentables**

2021

APROBACIÓN DE DOCTORADO

**“SÍNTESIS DE UN BIODIESEL DE 1.5 GENERACIÓN A PARTIR DE
MICROALGAS NATIVAS DEL NORESTE DE MÉXICO, UTILIZANDO
TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES”**

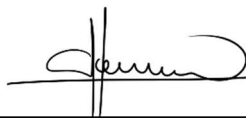
Dr. Pasiano Rivas García

Dr. Carlo Alvarado Escamilla

Dr. Javier Rivera de la Rosa

Dr.

Dr. J. José Rubén Morones Ramírez
Co-Asesor



Dra. Mónica M. Alcalá Rodríguez
Asesora

Dra. María Elena Cantú Cárdenas
Sub-Directora de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Doctora Mónica M. Alcalá Rodríguez y al Doctor José Rubén Morones Ramírez quienes fungieron como mi asesora y co-asesor de tesis y en todo momento proporcionaron su apoyo incondicional en la investigación y en lo personal para llevar a cabo este trabajo de investigación; así como a los doctores Pasiano Rivas García, Carlos Escamilla Alvarado, Javier Rivera de la Rosa y Juan Jacobo Ruiz Valdés por haber formado parte del comité de tesis y haber aportado siempre valiosas sugerencias y revisiones del presente trabajo.

Al laboratorio de alimentos, medicamentos y toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL, en especial a la química Irma Guadalupe García López y al M.C. Jesús Manuel Zaragoza García por apoyarme con los análisis de la materia prima generada en esta investigación. A si como al departamento de ecomateriales y energía de la Facultad de Ingeniería Civil, UANL en especial a la Dra. Leticia Myriam Torres Guerra.

Al Dr. Benjamín Limón Rodríguez por sus sabios consejos y por permitirme realizar este proyecto dentro de las instalaciones del departamento de ingeniería ambiental FIC, UANL para continuar desarrollándome en el ámbito laboral.

A mis compañeros del departamento de ingeniería ambiental, FIC, UANL, que, gracias a su apoyo, tuve la oportunidad y el tiempo para trabajar en esta investigación.

A mis padres por siempre están ahí para mí cuando los necesito, por alentarme y hacerme sentir que al tener un problema todo pasa, todo está bien y que lo más valioso es saber levantarte después de cada caída.

A mi hermana que me ayudó para ingresar al posgrado y a pesar de la distancia, siempre está conmigo apoyándome y compartiendo conmigo todos los momentos importantes de la vida.

A mi esposo que me apoyó y entendió en todo momento a pesar de no dedicarle el tiempo suficiente y de tener días buenos y malos durante este proceso.

A mi hijo que es mi motor para seguir esforzándome y ser un ejemplo para él.

Dedicatoria

*A mi familia,
que siempre ha estado apoyándome en todo momento*

Los amo 

RESUMEN

Jessica Cossette Canino Gómez
Universidad Autónoma de Nuevo León

Fecha de graduación: 2018
Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: SÍNTESIS DE UN BIODIESEL DE 1.5 GENERACIÓN A PARTIR DE MICROALGAS NATIVAS DEL NORESTE DE MÉXICO IMPLEMENTANDO TECNOLOGÍAS SUSTENTABLES.

Número de páginas: 130

Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con Orientación en
Procesos Sustentables

Área de estudio: Procesos Sustentables

Propósito y Método del Estudio: Algunas especies de microalgas debido a sus cortos ciclos de crecimiento y a su alto contenido en lípidos (TAGs) han sido consideradas como potenciales candidatos para la producción de biodiesel. No obstante, es posible inducir la síntesis de lípidos a través de la modificación de los factores determinantes de crecimiento; por lo que objetivo de este proyecto fue inducir la síntesis de lípidos en la microalga *Chlorella sp.* que fue aislada de un consorcio de microalgas procedentes de la presa Rodrigo Gómez “La Boca”, modificando y evaluando el impacto de los factores que intervienen en el proceso como: nutrientes, adición de concentración de CO₂ y longitudes de onda para determinar las variaciones tanto en la composición bioquímica, como en la concentración de lípidos (TAGs).

Contribuciones y Conclusiones: En esta investigación, el uso de un residuo orgánico (orina) como medio nutritivo (MOB_H) en el cultivo de *Chlorella sp.* mostró un incremento en la generación de biomasa, ácidos grasos y proteínas al compararse con el empleo del medio BG11. La obtención de ácidos grasos mediante la extracción con cloroformo registro un rendimiento bajo del 10%; sin embargo, su análisis arrojó que el cultivo de *Chlorella sp.* con el medio MOB_H registró una producción promedio de ácidos grasos saturados (SUFAs) de 17.22%, monoinsaturados (MUFAs) de 22.03% y poliinsaturados (PUFAs) de 60.73%. Con este proyecto se pretende el aprovechamiento de un residuo orgánico (orina) para la generación de biodiesel a partir de *Chlorella sp.* una microalga nativa del estado de Nuevo León.

Asesora: Dra. Mónica M. Alcalá Rodríguez

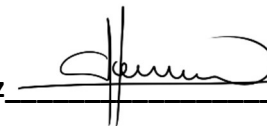


TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	II
TABLA DE CONTENIDO	III
LISTA DE TABLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VII
 Capítulo 1 INTRODUCCIÓN.....	 I
Introducción	2
 Capítulo 2 ANTECEDENTES	 4
2.1 Clasificación de los biocombustibles.....	4
2.2 Taxonomía de las algas.....	8
2.3 Biología de las microalgas, captación de la energía solar y síntesis de lípidos	9
2.4 Cultivo de microalgas.....	12
 Capítulo 3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	 16
3.1 Hipótesis.....	16
3.2 Objetivos.....	16
3.2.1 Objetivo general.....	16
3.2.2 Objetivos específicos	16
 Capítulo 4 METODOLOGÍA.....	 18
4.1 Estrategia general del proyecto.....	18
4.2 Muestreo y caracterización del cuerpo de agua	19
4.3 Identificación de las microalgas	20
4.4 Técnicas de aislamiento	21
4.5 Cultivo y pruebas preliminares de crecimiento con un medio nutritivo básico (MEB)	22
4.6 Cuantificación de la biomasa base seca	23
4.6.1 Tratamiento previo	23
4.6.2 Determinación de peso seco.....	23
4.7 Evaluación de los factores determinantes que intervienen en un cultivo de microalgas	24
4.7.1 Nutrientes	24

4.7.1.1 Cinéticas de crecimiento empleando dos diferentes medios nutritivos para el cultivo de microalgas	24
4.7.1.2 Caracterización de medios nutritivos MEB y BG11	25
4.7.1.3 Cinéticas de crecimiento mediante un residuo orgánico.....	25
4.7.1.4 Relación biomasa/sustrato de un macronutriente (Fósforo)	26
4.7.2 Inyección de CO ₂	26
4.7.2.1 Cinéticas de crecimiento mediante la adición de CO ₂	26
4.7.3 Factor luz.....	27
4.7.3.1 Cinéticas de crecimiento mediante tres fuentes de luz led	27
4.7.3.2 Determinación de crecimiento mediante espectrofotometría	28
4.7.3.3 Curva de calibración	28
4.8 Método de recuperación de biomasa de microalgas	29
4.8.1 Centrifugación.....	30
4.8.2 Sedimentación	30
4.9 Caracterización de la biomasa microalgal.....	31
4.9.1 Caracterización y determinación de componentes celulares.....	31
4.9.1.1 Determinación de proteínas	31
4.9.1.2 Determinación del extracto etéreo.....	32
4.9.1.3 Determinación de cenizas	32
4.9.1.4 Determinación de humedad	33
4.9.1.5 Determinación de carbohidratos	33
4.10 Métodos de extracción de ácidos grasos en microalgas	33
4.10.1 Métodos empleando solventes.....	33
4.10.2 Método asistidos por microondas.....	35
4.10.3 Confirmación de lisis celular mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM)	35
4.10.4 Perfil de ácidos grasos.....	36
4.11 Transesterificación.....	36
Capítulo 5 RESULTADOS	38
5.1 Muestreo y caracterización del cuerpo de agua	38
5.2 Identificación de las microalgas	39
5.3 Técnicas de aislamiento	41

5.4 Cultivo y pruebas preliminares de crecimiento con un medio nutritivo básico (MEB)	42
5.5 Evaluación de los factores determinantes que intervienen en un cultivo de microalgas	47
5.5.1 Nutrientes	47
5.5.1.1 Cinéticas de crecimiento empleando dos diferentes medios nutritivos para el cultivo de microalgas	47
5.5.1.2 Caracterización de los medios MEB Y BG11	50
5.5.1.3 Cinética de crecimiento mediante un residuo orgánico (MOB)	50
5.5.1.4 Relación biomasa/sustrato en la cinética de crecimiento de <i>Chlorella</i> sp. en MOB en concentración de 0.015 g L ⁻¹	52
5.5.2 Inyección de CO ₂	54
5.5.2.1 Cinéticas de crecimiento mediante la adición de CO ₂	54
5.5.3 Factor luz	55
5.5.3.1 Cinética de crecimiento mediante tres fuentes de luz led	55
5.6 Métodos de recuperación de la biomasa de microalgas	57
5.7 Caracterización de la biomasa microalgal	58
5.7.1 Caracterización y determinación de los componentes celulares	58
5.8 Métodos de extracción de ácidos grasos	59
5.8.1 Confirmación de lisis celular mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM)	60
5.8.2 Perfil de ácidos grasos	61
5.9 Transesterificación	65
Capítulo 6 DISCUSIÓN	66
6.1 Muestreo y caracterización del cuerpo de agua	66
6.2 Cultivo y pruebas preliminares de crecimiento con un medio nutritivo básico (MEB)	67
6.3 Evaluación de los factores determinantes que intervienen en un cultivo de microalgas	68
6.4 Perfil de ácidos grasos	73
6.5 Transesterificación	75
Capítulo 7 CONCLUSIÓN	77
Capítulo 8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

LISTA DE TABLAS

Tabla. Características del biodiesel	6
Tabla. Comparación en rendimiento de fuentes de biodiesel.....	10
Tabla. Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas	18
Tabla. Coordenadas UTM de los puntos de muestreo	31
Tabla. Caracterización de la presa Rodrigo Gómez "La Boca"	55
Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos de muestreo y un blanco	60
Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 0.1 g L ⁻¹	61
Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 1 g L ⁻¹	63
Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 2 g L ⁻¹	65
Tabla. Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> y un consorcio de microalgas con dos medios nutritivos, fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, bajo luz blanca fluorescente	67
Tabla. Caracterización de los medios nutritivos (BG11, MEB y MOB)	70
Tabla. Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> y el consorcio de microalgas en medio nutritivo MOB en diferentes concentraciones bajo luz blanca en ciclos de 12 horas luz obscuridad.	71
Tabla. Perfil bromatológico de <i>Chlorella sp.</i> en dos medios de cultivo.	86
Tabla. Determinación de la concentración de ácidos grasos de <i>Chlorella sp.</i> en dos medios de cultivo.	93
Tabla. Determinación de la concentración de ácidos grasos de <i>Chlorella sp.</i> en dos medios de cultivo.	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de biocombustibles líquidos	9
Figura 2 Árbol filogenético	13
Figura 3 Biosíntesis de TAG's en una microalga.....	16
Figura 4 Curva de crecimiento	20
Figura 5 Sistemas de cultivo de microalgas	22
Figura 6 Transesterificación.....	24
Figura 7 Mecanismo de la reacción de transesterificación	25
Figura 8 Diagrama de flujo general del procedimiento experimental del proyecto.....	29
Figura 9 Localización de los puntos de muestreo	31
Figura 10 Técnica de aislamiento por dilución seriada.....	33
Figura 11 Esquema del cultivo de microalgas con medio MEB	35
Figura 12 Esquema de la adicción de CO ₂ + aire atmosférico.....	42
Figura 13 Estructura tipo cámara con diferentes longitudes de onda	43
Figura 14 Curva de calibración	44
Figura 15 Microalgas de la Presa Rodrigo Gómez "La Boca".	57
Figura 16 Microalgas de la presa Rodrigo Gómez "La Boca"	57
Figura 17 Microalga nativa de la presa Rodrigo Gómez "La Boca" del género <i>Chlorella</i> <i>sp.</i>	58
Figura 18 Prueba preliminar de crecimiento mediante un blanco.....	60
Figura 19 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 0.1 g L ⁻¹	62
Figura 20 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso.....	64
Figura 21 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso.....	65
Figura 22 Cinética de crecimiento con MEB y BG11.....	68

Figura 23 Cinética de crecimiento con MEB y BG11.....	69
Figura 24 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> en medio MOB.....	72
Figura 25 Cinética de crecimiento del consorcio de microalgas	73
Figura 26 Relación biomasa/sustrato de <i>Chlorella sp.</i>	74
Figura 27 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> y	77
Figura 28 Cinéticas de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> y consorcio de microalgas,.....	78
Figura 29 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> bajo el efecto	81
Figura 30 Efecto del tiempo de cultivo de <i>Chlorella sp.</i> para tres diferentes longitudes de onda y dos medios nutritivos.....	82
Figura 31 Cinética de crecimiento de <i>Chlorella sp.</i> bajo el efecto	83
Figura 32 Perfil bromatológico de la biomasa de <i>Chlorella sp.</i> con los medios BG11 y MOB en concentración de 0.015 g L ⁻¹ en cultivo de luz blanca con ciclos de 12 horas L:O.....	87
Figura 33 Micrografía electrónica de barrido en dos resoluciones (SEM)	92
Figura 34 Perfil de ácidos grasos en la biomasa de <i>Chlorella sp.</i> con los medios BG11 y MOB en concentración de 0.015 g L ⁻¹ en cultivo de luz blanca con ciclos de 12 horas L:O.....	95
Figura 35 Cromatograma (análisis FAMES) ampliado durante	96
Figura 36 Cromatograma (análisis FAMES) ampliado durante	97
Figura 37 Perfil de ácidos grasos en <i>Chlorella sp.</i> y un consorcio	98
Figurura 38 Esquema de la producción de biodiesel mediante transesterificación química	102

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la energía que requerimos para satisfacer nuestras necesidades proviene principalmente de combustibles fósiles y su uso se ha incrementado con el paso de los años no obstante de las crisis energéticas que hemos padecido; esta tendencia no ha cedido, por lo que actualmente el 88% del consumo energético proviene de esta fuente [1]. A mediados de los años 70's se originó el concepto de energías renovables, proponiendo una alternativa a la fuente energética convencional, lo que hoy en día representa un consumo energético del 12% aproximadamente a nivel mundial [2].

Las energías renovables provienen de un origen natural que tiene la capacidad de regenerarse, por lo que son consideradas como una fuente energética limpia y las más comunes son: la energía hidráulica, eólica, solar y geotérmica. Estas fuentes energéticas están relacionadas con los cuatro principales elementos naturales (agua, aire, fuego, tierra) y no generan ningún contaminante. De la misma manera se encuentra la energía generada a partir de la biomasa, la cual es denominada como energía verde, puesto que se genera en base a fuentes de energía primaria y no contamina; es decir, su obtención no emite subproductos que dañen al medio ambiente.

Significa entonces que a partir de la biomasa se generan los bioenergéticos que son combustibles provenientes de materia orgánica producto de diferentes actividades como: agrícola, pecuaria, silvícola, acuacultura, algacultura, a partir de residuos (comerciales, pesca, domésticos e industriales), microorganismos, enzimas y de sus derivados procedentes de procesos biotecnológicos [2].

Estos bioenergéticos son conocidos como biocombustibles [3], los cuales pueden ser transformados, procesados y se pueden presentar en diferentes formas, como: los sólidos (leña, carbón vegetal, residuos agrícolas y forestales, pellets y briquetas) que son quemados al utilizarlos; líquidos (bioetanol y biodiesel) obtenidos a partir de cultivos energéticos como caña de azúcar y oleaginosas o aceites vegetales usados; y gaseosos (biogás, biometano y biohidrógeno) derivados de residuos municipales, estiércol, etc. [4].

En relación con los biocombustibles líquidos (Biodiesel) se obtienen principalmente por transesterificación (reacción de un triacilglicérido con un alcohol); esta reacción es llevada cabo mediante el uso de un catalizador, normalmente una base fuerte para obtener una mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) [5]. El biocombustible ha sido empleado en el mundo a través el paso de los años; uno de los registros más antiguos se tiene de Francia en 1936; en Brasil, en 1975, fue oficialmente creado un programa llamado gashol (mezcla de 10% etanol y 90% gasolina) como consecuencia de su crisis energética; situación similar se presentó en Europa y Alemania en los años 90's;

en donde el consumo de biodiesel se incrementó y ha sido suministrado en miles de estaciones de servicio hasta la fecha [6].


Malasia en 2007 produjo y exportó 340 millones de litros de aceite de palma para la generación de biodiesel; Indonesia 185 millones; de igual manera Argentina en el año 2012 produjo 2.4 millones de toneladas de biodiesel a partir de soja [7]. De acuerdo con proyecciones de la Agencia Internacional de Energía [8, 7], el incremento de las áreas cultivables para la generación de biodiesel representará un problema, ya que para el año 2030 entre 35 y 53 millones de hectáreas (2.5 a .8% de la superficie cultivable mundial) serán destinadas para este fin.

Por otra parte, en México su uso fue tardío en comparación con el resto de mundo; se inició la generación de biocombustibles al aprobarse la Ley de Promoción y Desarrollo de los Bioenergéticos (LPDB) con la generación de programas en diferentes estados. Uno de ellos, es el programa de Introducción a los bioenergéticos, creado por la Secretaría de Energía (SENER), en el que su objetivo principal consistió en brindar certidumbre para el desarrollo de la cadena de producción y consumo; otro programa fue el de Producción Sustentable de Insumos para Bioenergéticos y de Desarrollo Científico y Tecnológico 2009-2012 creado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el que se pretendió, establecer acciones que permitan el desarrollo sustentable de las zonas rurales de campo y su integración en la cadena productiva de los bioenergéticos [9].

Por las consideraciones anteriores, América Latina es considerado el más grande productor de insumos para la generación de biodiesel a partir de cultivos energéticos; y de continuar con esta tendencia para el 2030 se requerirán cultivar 70 millones de hectáreas de soya únicamente para cubrir la demanda de la Unión Europea [10], sin incluir el área requerida para el consumo local; por lo que la producción a esta escala dejaría serias consecuencias para los países productores. Lo que representa un alza en el consumo de agua, la aplicación de fertilizantes y la inversión para el cultivo y procesamiento de la biomasa para la producción de biodiesel.

El uso de las microalgas en la producción de biodiesel surgió como una opción promisorio debido a que presentan una mayor eficiencia fotosintética, son más eficaces en la asimilación de nutrientes y CO₂ con relación a las plantas; y almacenan entre el 20 y el 80% de triglicéridos. [11] Además estos microorganismos tienen la capacidad de generar biomasa a partir de CO₂ y luz (Consumiendo hasta 2 kg. de CO₂ por Kg de biomasa producido). Esta biomasa es rica en proteína, lípidos, carbohidratos, contenido de vitaminas y minerales.

Las microalgas son una fuente de múltiples beneficios para el hombre, extendiéndose su aplicación tanto a la rama alimenticia, agricultura, acuicultura, farmacología, cosmética y generación de energía limpia.



Por lo tanto, la investigación y la mejora en las técnicas para la obtención de nuevas generaciones de biocombustibles incrementarían la producción de biodiesel sin generar competencia con el uso de la tierra destinada a la producción de alimentos y al mismo tiempo disminuirán el consumo de agua requerida para su cultivo.

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

De acuerdo con la ASTM (American Society for Testing and Material Standard), el biodiesel puede describirse como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena larga, derivados de lípidos totales como aceites vegetales o grasas de animales.

El biodiesel posee características fisicoquímicas muy similares a las del diesel de petróleo (Tabla características del biodiesel). Su uso no requiere grandes cambios en los motores de diesel convencional; por lo que puede emplearse directamente, o bien utilizar como aditivo mezclando en proporciones con el diesel (gashol).

Tabla. Características del biodiesel

Propiedad	Biodiesel de Aceite de Algas	Diesel de Petróleo	Estándar según ASTM
Densidad (Kg L ⁻¹)	0.864	0.838	0.84-0.9
Viscosidad (mm ² s ⁻¹ a 40°C)	5.2	1.9-4.1	3.5 – 5

Propiedad	Biodiesel de Aceite de Algas	Diesel de Petróleo	Estándar según ASTM
Punto de ignición (°C)	115	75	Mínimo 100
Punto de fusión (°C)	-12	-50 a 10	No Registrado
Índice de acidez Mg KOH g ⁻¹	0.374	Máximo 0.5	Máximo 0.5
Proporción de Hidrógeno/Carbono	1.81	1.81	No Registrado

Fuente: Gandulia et al., 2009 [12]

La composición de un biocombustible líquido (biodiesel), está ligada a la materia prima de la cual proviene; es decir sus características físicas y químicas son alteradas de acuerdo con el material que sea empleado para su producción. En relación con lo antes mencionado, los biocombustibles son clasificados en las siguientes generaciones (Figura 1) de acuerdo con el manual de biocombustible [12, 13,14].

2.1 Clasificación de los Biocombustibles líquidos (Biodiesel)

Biocombustible de primera generación. Comprende a la generación existente de biocombustibles, fundados en el empleo de materias primas que además tienen usos alimentarios (caña de azúcar, remolacha azucarera, maíz, palma, soja, etc.) y procesos sencillos de fermentación (bioetanol) y transesterificación (biodiesel).

Biocombustible de 1.5 generación. Son los biocombustibles obtenidos con tecnologías habituales y con materiales alternativos a las de mayor disponibilidad inmediata, y que no representa una competencia en la producción de alimentos.

Entre estas materias primas se encuentran diversas especies arbóreas perennes, arbustivas, algas y otras alternativas con potencial para prosperar en tierras marginales, abandonadas o degradadas, zonas semiáridas y áridas.

Biocombustible de segunda generación. Esta generación, representa una alternativa que permite substituir el almodón, los azucares y los aceites de os materiales utilizados en la primer generación, por diversas formas de biomasa lignocelulósica (residuos agrícolas, forestales primarios y secundarios, hierbas perenes y árboles de crecimiento rápido).

Biocombustibles de tercera generación. Esta generación esta basada en el uso de cultivos adaptados o diseñados a partir de técnicas genómicas, moleculares y de transgénicos para obtener materiales con mayor eficiencia para la producción de bioproductos y biocombustibles.

Biocombustible de cuarta generación. Esta generación, representa un aporte en la mitigación del cambio climático al integrar el término “bioenergía con balance negativo de carbono”. Este concepto la producción de biocombustibles y la agro energía se fusiona con la métodos de captura y almacenamiento de carbono como materia prima y con su tecnología de proceso. Estos desarrollos, representan una evolución de la tercer generación, ya que se obtienen a partir de materias primas diseñadas para capturar altas concentraciones de CO₂.

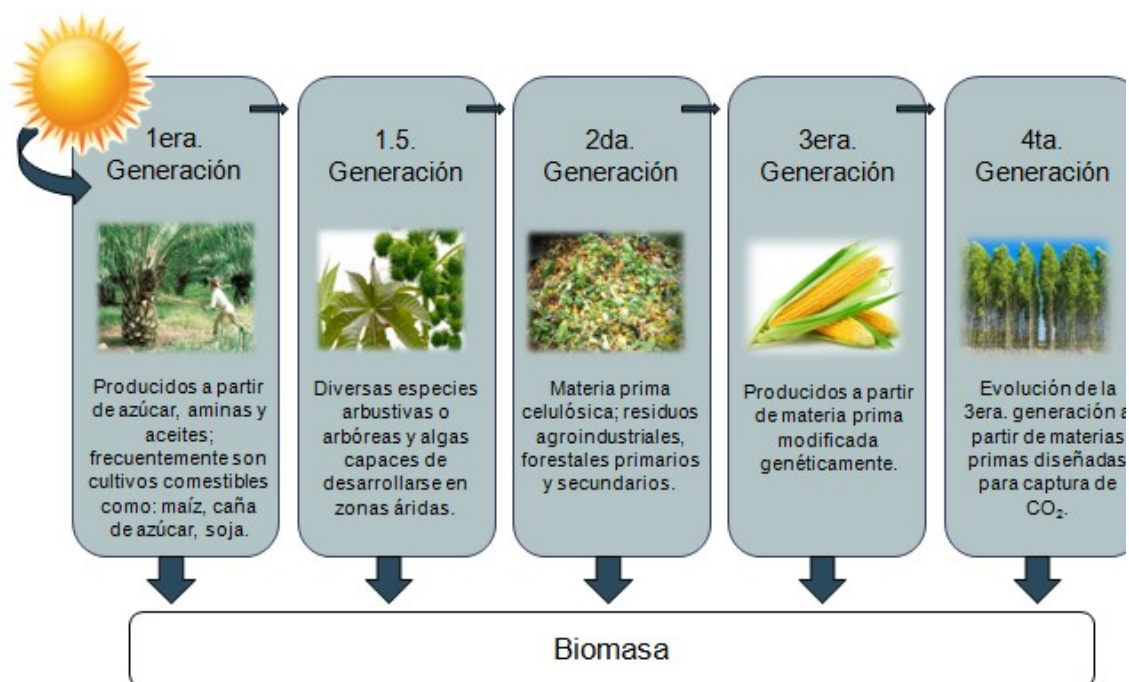


Figura 1 Clasificación de biocombustibles líquidos
Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con las consideraciones anteriores el trabajar con algas, es más sustentable que la producción de biocombustible de primera y segunda generación [11], ya que no compiten por tierras cultivables, su facultad de reproducción es mayor y requieren menor procesamiento.

Por lo que su uso para generar biocombustible está centrado en complementar o ser una vía alternativa en la generación de energéticos; esto ha surgido como una opción promisorio, debido a que presentan mayor capacidad fotosintética y son más eficaces en la fijación de CO₂, (1 kg en peso seco de biomasa de algas, utiliza cerca de 1.83 kg de CO₂) [15] y otros nutrientes con respecto a las plantas; acumulan entre 20 y 80% de triglicéridos durante su crecimiento [16]; demandan menor consumo de agua y pueden cultivarse en diferentes ambientes [17, 18].

Incluso tienen la capacidad de producir todo el año. Por lo tanto, la productividad de aceite de estos cultivos supera en rendimiento a los mejores cultivos procedentes de semillas oleaginosas, por ejemplo, el rendimiento de biodiesel es de 45,420 litros por 1 hectáreas de algas (producidas en estanque abierto), en comparación con 5,109.75 litros de biodiesel por 1 hectáreas de aceite crudo de palma [19].

Con relación a los cultivos tradicionales; el cultivo de palma es considerado un cultivo de alto rendimiento y bajo requerimiento de tierras; no obstante, el 24% del total de las tierras de cultivo en Estados Unidos, debería ser dedicadas a su cultivo para cubrir solo el 50% del requerimiento de combustible para transporte (Tabla Comparación en rendimiento de fuentes de biodiesel); claramente estos cultivos, no pueden contribuir significativamente a la sustitución de combustibles líquidos derivados del petróleo en el futuro previsible. Este escenario cambia drásticamente, si se utilizaran microalgas para la producción de biodiesel [18]. Es decir, entre el 1 y el 3% del área total de cultivo en los Estados Unidos sería suficiente para producir biomasa microalgal que satisfaga el 50% de las necesidades de combustible de transporte.

Tabla. Comparación en rendimiento de fuentes de biodiesel

Cultivo	Rendimiento aceite (L/ha/año)	Área de cultivo (ha x10⁶)^a	% del Área de cultivo en Estados Unidos^a
Maíz	172	1540	846
Soya	446	594	326

Cultivo	Rendimiento aceite (L/ha/año)	Área de cultivo (ha x10⁶)^a	% del Área de cultivo en Estados Unidos^a
Canola	1190	223	122
Jatropha	1892	140	77
Coco	2689	99	54
Palma	5950	45	24
Microalgas ^b	136,900	2	1.1
Microalgas ^c	58,700	4.5	2.5

Fuente: Chisti, Y. (2007)

^a Para satisfacer el 50% de las necesidades de transporte en Estados Unidos

^b 70% aceite (en peso) en biomasa

^c 30% en aceite (en peso) en biomasa

Aunado a esto, se sabe que estos organismos tienen la capacidad de remover de un medio acuático cantidades significativas de nitrógeno (N) y fosforo (P) durante su crecimiento, de absorber metales y de acelerar la inactivación de bacterias patógenas [20-23]; adicionalmente generan biomasa que representa una fuente potencial para la producción de múltiples productos de valor agregado (alimentos, químicos, pigmentos y cosméticos) [24, 25]; entre ellos biocombustibles [26]. Es por esto que son considerados como la materia prima del futuro; además con respecto al cambio climático son una alternativa al tratarse de un recurso inagotable, no contaminante y captador de CO₂.

De manera que resulta oportuno mencionar que las algas son organismos clasificados como talofitos (es decir, plantas inferiores, con estructura simple y ausencia de raíz, tallo y hojas); son acuáticas principalmente con metabolismos autótrofos (utilizan una fuente inorgánica de carbono como CO₂) que presentan como pigmento fotosintético primario la clorofila a, característica que comparten

con las plantas superiores [27]. Estos individuos poseen la capacidad de realizar la fotosíntesis oxigénica (fotosíntesis que produce oxígeno); pueden estar constituidos de una célula (unicelulares) o de varias (pluricelulares), y son microscópicas o macroscópicas con diversas variaciones morfológicas.

Diversos autores reportan que este grupo representa un recurso inexplorado, debido a que su número de taxones es elevado; menos de 50 especies (de entre las más de 30,000 descritas) se han estudiado a detalle desde el punto de vista fisiológico, bioquímico y aproximadamente una docena son aprovechadas desde el punto de vista biotecnológico [27].

2.2 Taxonomía de las algas

Como menciono anteriormente las algas comparten características con las plantas superiores; por lo cual, están clasificados dentro del phylum Plantae dominio Eukarya (Figura 2). Por otro lado, existe un grupo de ellas que son denominadas algas verde azules (cianobacterias) y pertenecen al dominio Bacteria en específico al Phylum Cyanobacteria [28]. Esta clasificación ha surgido al comparar las secuencias de RNAs ribosómicos.

Evolutivamente estos organismos se han categorizado por su pigmentación, ciclo de vida y estructura celular [21]. Así las microalgas se clasifican en las siguientes divisiones: *Cyanophyta* y *Prochlorophyta*, *Glaucophyta*, *Rhodophyta*, *Heterokontophyta*, *Cryptophyta*, *Dinophyta*, *Euglenophyta*, *Chlorarachniophyta* y

Chlorophyta [28]. Sin embargo, de acuerdo con Khanet la clasificación de microalgas puede ser realizada de manera más sencilla; dividir las en cuatro grupos principales de acuerdo con su abundancia: diatomeas, algas verdes, algas verde-azules y algas pardas o doradas [29].

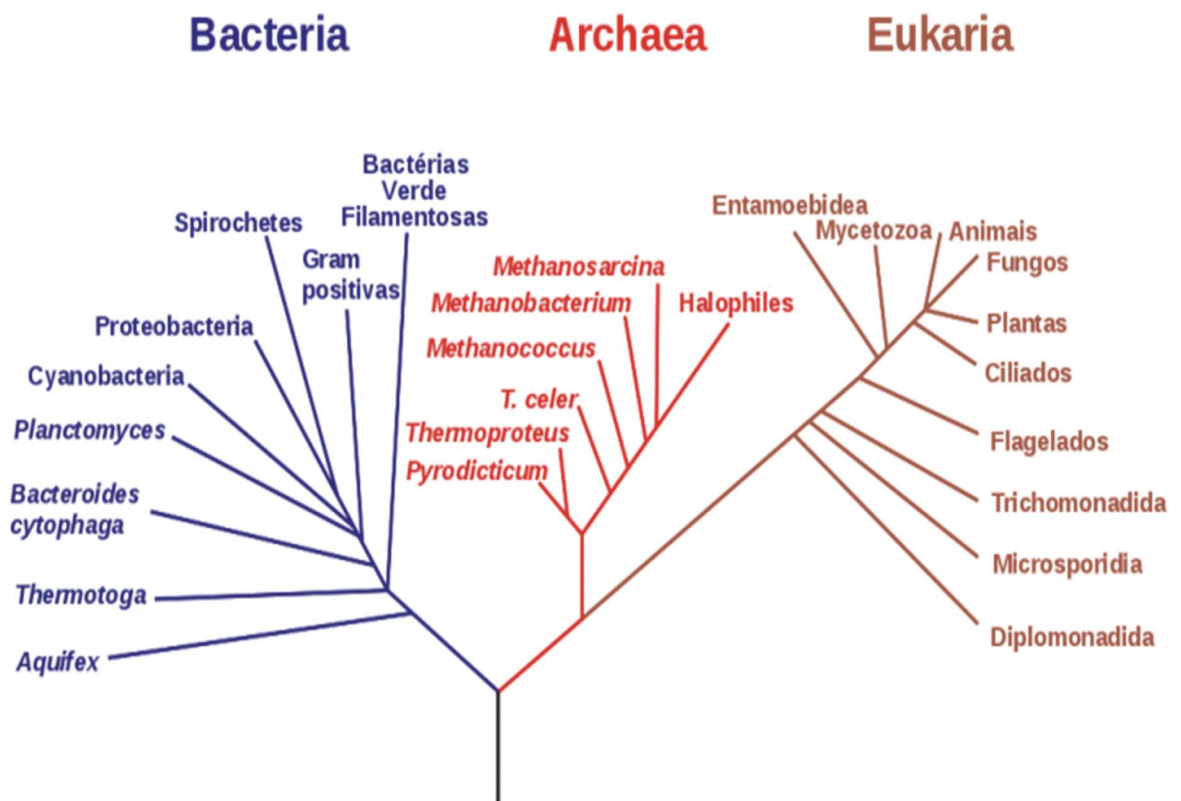


Figura 2 Árbol filogenético
Fuente. A partir de Madigan et al. (2004) [28]

De acuerdo con la clasificación antes mencionada, podemos citar que uno de los grupos más abundantes de microalgas es el que corresponde a las algas verdes, la cual se encuentra en el Dominio Eukarya, Phylum Plantae, División

Chlorophyta, Clase Trebouxiophyceae, Orden Chlorellales, Familia Chlorelaceae.

2.3 Biología de las microalgas, captación de la energía solar y síntesis de lípidos

Estos microorganismos poseen un importante papel en la naturaleza ya que requieren únicamente de compuestos inorgánicos como CO₂, sales, agua y una fuente de energía lumínica para su crecimiento [30]; se encuentran dispersos en cuerpos de agua dulce y salada; aunque algunos de ellos se han adaptado a la vida terrestre siempre y cuando exista un elevado índice de humedad en el ambiente.

Las microalgas contienen ácidos grasos como productos de almacenamiento y como fuente de energía [31-34]. Estos organismos dependientes de la luz están relacionados directamente con el proceso fotosintético. En microalgas verdes la ruta metabólica para la síntesis de ácidos grasos comienza por la unión del complejo luz-biomasa (Figura3); el cual esta mediado por la clorofila II y carotenoides, los cuales capturan la energía lumínica en forma de fotones [35]. La energía es empleada por el fotosistema II en la oxidación catalítica del agua, liberando protones, electrones y O₂ molecular. Los electrones se transportan mediante la cadena de transporte fotosintética para promover la producción de NADPH mediante la reducción de ferredoxina. Dentro del lumen tilacoidal se genera un gradiente electroquímico, debido a la liberación de protones después de la oxidación de agua; el cual se emplea para la formación de Adenosina

trifosfato (ATP) mediante la vía ATP sintasa. Los productos de la fotosíntesis son las biomoléculas Nicotinamida-Adenina-Dinucleótico-Fosfato (NADPH), relacionada con el poder reductor y el ATP que es la principal fuente de energía de los seres vivos para realizar sus actividades metabólicas. Estas biomoléculas son el sustrato del ciclo de Calvin [36]; en donde el CO₂ es fijado en moléculas de 3 átomos de carbono (3C), las cuales a su vez son asimiladas como carbohidratos, lípidos y proteínas; y la enzima ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCO) cataliza la conversión de CO₂ y ribulosa-5-fosfato en dos triosas, las cuales son transformadas subsecuentemente en piruvato y acetil-CoA [37].

Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas dentro del cloroplasto por acetil-CoA carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA [38] molécula que es transferida a la proteína acarreadora de grupos acil (ACP) del complejo multi-enzimático sintasa de ácidos grasos (SAG); donde la subunidad cetoacil-ACP sintasa (CAS) cataliza la condensación de malonil-ACP mediante tres reacciones cíclicas: reducción, deshidratación y reducción; condensando el producto con otra molécula de malonil-CoA [39]. El ciclo se repite hasta formar cadenas saturadas de ácido palmítico (16:0) o esteárico (18:0). La enzima ACP-sintasa abre la cadena acil y libera el ácido graso [40], y la formación de tiacilglicerol se lleva a cabo en el retículo endoplasmático [41].

De acuerdo con Fernández *et al.* (2012) [32], para la síntesis de triacilgliceroles (TAGs) la primera reacción es la condensación de glicerol-3-fosfato (G3P) con la

acil-CoA para formar lisofosfátido (LPA), el cual es catalizado por acil-CoA: glicerol-*sn*-3-fosfato acil-transferasa (GPAT) y otra molécula de acil-CoA para producir fosfatidato (PA) [32]. Posteriormente, PA puede ser desfosforilado por la enzima ácida fosfatídico fosfatasa (PAP) para formar diacilglicerol.

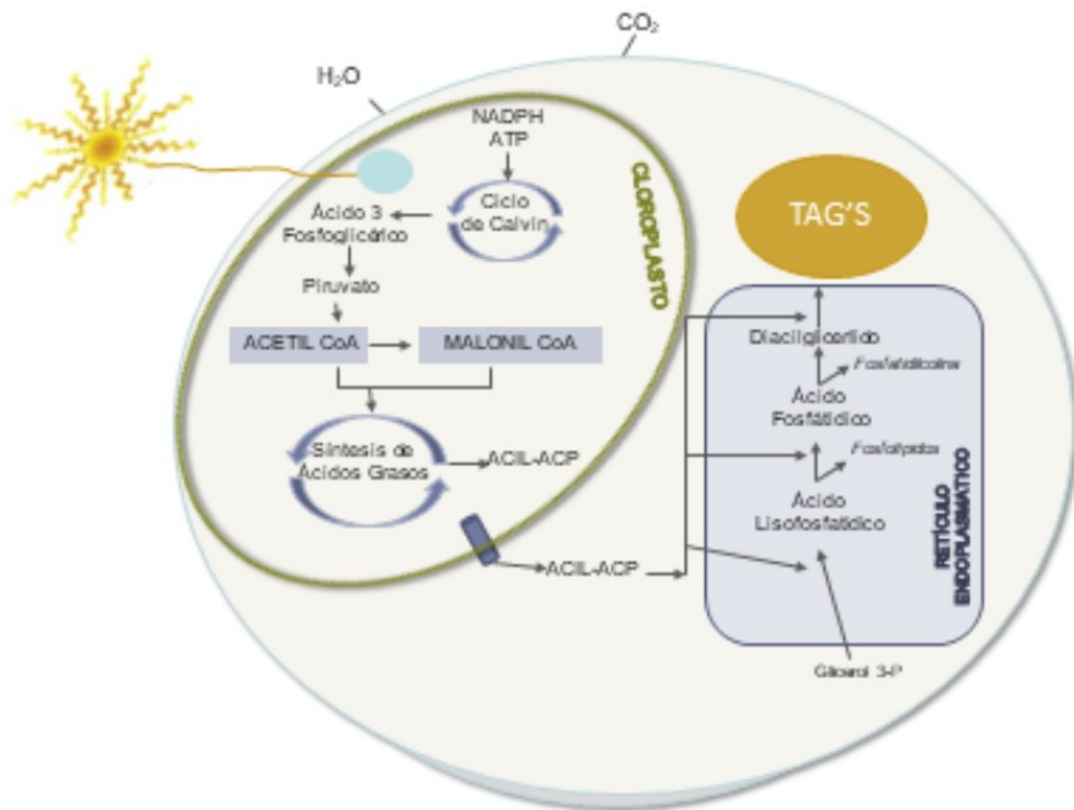


Figura 3 Biosíntesis de TAG's en una microalga
Fuente propia, basado en Beer *et al.* (2009) [35]

Finalmente, la síntesis de TAGs es catalizada por acil-CoA: diacilglicerolacil-transferasa (DGAT), la cual incorpora un tercer grupo acil-CoA a la molécula

diacilglicerol, los TAGs resultantes son almacenados en cuerpos de aceites [42], los cuales pueden ser utilizados como materia prima para obtener biodiesel.

Estos TAGs, normalmente contienen ácidos grasos diferentes en su estructura [43]; con cadenas de carbono generalmente de 16 y 18 átomos; siendo los más comunes: el palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolínico (18:3) en los aceites vegetales; esta diversificación de ácidos grasos y sus concentraciones conforman el perfil de ácidos grasos, el cual presenta diferentes características físicas y químicas debido a su estructura, que a su vez influyen en las propiedades del aceite [44].

La mayoría de las especies producen aceites en el rango de 20-50% del peso seco de la biomasa; las tasas de crecimiento exponencial pueden duplicar su biomasa en periodos cortos de 3.5 horas [45, 46, 47]. Aunado a esto, se ha demostrado que la limitación de nitrógeno y fósforo incrementa el contenido lipídico en las microalgas [36, 38]; ante la situación planteada es necesario definir un método adecuado de cultivo para la obtención del producto deseado.

2.4 Contenido lipídico en microalgas

Dentro de las algas unicelulares se han observado que existen especies productoras de lípidos, entre las cuales algunas de las mejor estudiadas son *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dunaliella salina*, *Dunaliella tertiolecta*, *Monodus subterraneus*, *Scenedes musobliquus*, *Botryococcus braunii*, *Phaedactylum*

tricornutum, *Thalassiosira pseudonana*, así como los géneros *Nannochloropsis*, *Nitzschia*, *Isochrysis* y *Chlorella* sp. [48].

En la tabla siguiente, se menciona el contenido de lípidos en peso seco de algunas microalgas oleaginosas utilizadas para producción de lípidos, así como sus rendimientos diarios, reportados por distintos autores.

Tabla. Contenido de lípidos de algunas especies de microalgas

Especie	Contenido de lípidos ^a	Productividad ^b	Referencia
<i>Parietochoris incisa</i>	60	NR	Slovento <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	60	0.204	Rodolfi <i>et al.</i> (2009)
<i>Neochlorisoleo abundand</i>	56	0.013	Gouveia <i>et al.</i> (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	42	0.012	Widjsjs <i>et al.</i> (2009)
<i>Cryptocodinium cohnii</i>	41.4	0.082	Mendoza <i>et al.</i> (2008)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	43	NR	Mandal y Malick (2009)
<i>Neochlorisoleo abundans</i>	38	0.133	Li <i>et al.</i> (2008)
<i>Nannochloropsis</i> sp.	28.7	0.09	Gouveia y Oliveira (2009)
<i>Chlorella vulgaris</i>	27	0.127	Francisco <i>et al.</i> (2010)
<i>Chlorella</i> sp.	10.0-48.0	0.042	Mata <i>et al.</i> (2010)
<i>Dunaliella</i> sp.	67	0.033	Takagi <i>et al.</i> (20016)
<i>Choricystis minor</i>	21.3	0.082	Mazzuca- Sobzuk y Chisti (2010)
<i>Chlorella protothecoides</i>	50.3	NR	Xiong <i>et al.</i> (2008)
<i>Chlorella vulgarisus</i>	21	0.054	Lang <i>et al.</i> (2009)
<i>Scenedesmus rubescens</i>	73	NR	Matsunaga <i>et al.</i> (2009)

a) Contenido de lípidos en porcentaje en relación a su biomasa seca

b) Productividad de lípidos en g L⁻¹ d⁻¹

NR- No reportado

2.5 Cultivo de microalgas

En el caso de las microalgas, el proceso de producción para la obtención de compuestos de interés es de vital importancia. El primer paso es la selección de la microalga con las características óptimas para el fin propuesto; es decir, con tolerancia a la temperatura, pH, irradiancia, alta tasa de reproducción, elevado rendimiento en el compuesto de interés y facilidad de cosecha. De acuerdo con el régimen de operación de los cultivos, estos pueden clasificarse en: lotes, semicontinuos y continuos [49].

El cultivo por lote es el método más empleado en los procesos microbiológicos; se inicia con un medio de cultivo definido con condiciones óptimas, se inocula con una concentración inicial de biomasa y se deja evolucionar con el tiempo. En donde, la concentración de biomasa se incrementa hasta agotar los nutrientes y finalmente se cosecha.

El cultivo de microorganismos presenta una curva de crecimiento de tipo logarítmico, la cual representa la evolución del crecimiento en relación con la disponibilidad de nutrientes. En cada curva se observan cuatro fases típicas (figura 4): Fase de adaptación, fase de crecimiento exponencial, fase estacionaria y fase de muerte celular. En los cultivos discontinuos la fase de adaptación es casi inexistente y principalmente se está enfocado en la fase de crecimiento exponencial y la fase estacionaria [50].

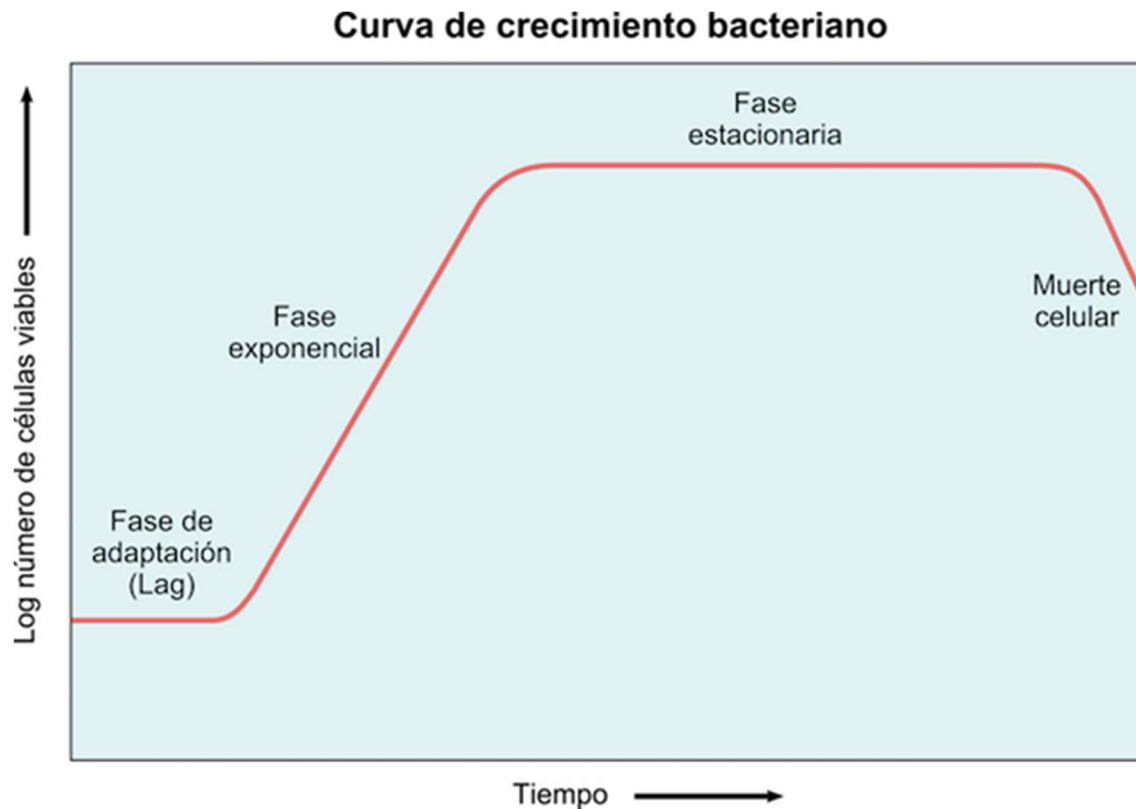


Figura 4 Curva de crecimiento
Fuente. Romero, 2007

Los cultivos continuos se caracterizan por un aporte constante de medio fresco, una mezcla homogénea inmediata y la salida continua de la biomasa generada. Este modo de operación permite mantener estados de equilibrio dinámico, determinados por el valor de la velocidad de dilución impuesta (tasa de renovación o aporte de medio fresco). Cuando la velocidad específica de crecimiento (μ) iguala a la velocidad de dilución (D), se genera un estado estacionario en el que se mantiene un valor de densidad celular, de manera que se compensa la generación de células por crecimiento con la dilución producida por el aporte de medio fresco [49, 51].

Los cultivos semicontinuos son una situación intermedia donde se realizan diluciones cada cierto tiempo renovando una parte del cultivo mediante el cosechado de biomasa y la recuperación del volumen con medio fresco [52]. Estos cultivos, se operan de forma similar a los de lote, cosechando parcialmente en intervalos regulares, reponiendo el cosechado con medio fresco.

2.6 Biorreactores

La producción de biomasa a partir de microalgas está vinculada a la disponibilidad de luz, siendo este un factor detonante en su cultivo. Es por esto, que existen varios sistemas o métodos de cultivo. Recordemos que a través del tiempo han sido utilizadas para la producción de productos de valor agregado.

Las características deseables en un biorreactor son: 1- debe ser adecuado para el cultivo de varias especies de microalgas y ser universal; 2- Proporcionar la mayor cantidad de luz posible, 3- Tener un buen intercambio gaseoso de CO₂ a O₂; 4- Alta tasa de transferencia de masa y temperatura sin dañar la célula o inhibir su crecimiento; 5- Minimizar la sedimentación, 6- Bajo costo de construir y operar y 7- Escalables [53].

Estos sistemas de cultivo de microalgas se pueden clasificar según su configuración y tipo de funcionamiento en sistemas abiertos (estanques) y sistemas cerrados (biorreactores) (Figura 5) [33]. Los sistemas abiertos son los más habituales para la producción comercial de microalgas, ya que presentan

una tecnología relativamente sencilla debido a que comúnmente son estanques con profundidades de 20 a 50 cm.

Sin embargo, este método presenta algunas desventajas entre las que se encuentran, un elevado índice de contaminación, a un mezclado poco eficiente y lo más relevante a la limitación de luz en las capas inferiores; en contraste con los biorreactores que son sistemas que permiten el control de los parámetros necesarios para el cultivo, si bien es cierto que presentan considerables beneficios, cabe mencionar que son sistemas con altos costos de fabricación, operación y mantenimiento [54]. No obstante, son sistemas automatizados en donde se les provee CO_2 y nutrientes para maximizar su productividad; son a priori los sistemas más productivos de todos.



Figura 5 Sistemas de cultivo de microalgas

Existe una gran variedad de biorreactores y distintas configuraciones (serie, paralelo, batch, continuo, semi- continuo), tales como el tanque agitado, lecho fijo, lecho fluidizado, lechos de goteo, de recirculación (Air-lift), columna de burbujeo, tubulares y paneles planos [55, 56]. Para controlar los parámetros de funcionamiento del biorreactor (nutrientes, pH, oxígeno disuelto, temperatura, etc.) es necesario favorecer las funciones deseadas de las células vivas o enzimas. El biorreactor elegido debe ser caracterizado y optimizado funcionalmente, ya que el éxito depende en gran medida de sus sistemas de control y apoyo.

Sin embargo, a pesar de presentar productividades altas, estos equipos presentan problemas de rentabilidad económica, elevados tiempos de residencia y un alto consumo energético [57]. En el caso de la producción de biodiesel, el proceso global puede ser simplificado efectuando la extracción de lípidos a partir de biomasa húmeda omitiendo la técnica de secado, lo que reduce el tiempo y los costos de extracción [15], [27], [58]. Además, la transesterificación in situ es un método para eliminar la etapa de extracción de aceite para la generación de biodiesel, o en su caso realizar la conversión directa biomasa biodiesel [25], [29]. Este último método muestra un alto contenido de fosfolípidos como resultado de la extracción eficiente [42].

2.7 Transesterificación

La transesterificación, es un término designado para una reacción orgánica, que es producida por el intercambio de los grupos acilo o alquilo de un éster [59]. Esta reacción ocurre cuando los triglicéridos contenidos en los aceites y las grasas se combinan con un alcohol de bajo peso molecular (Metanol) para producir una mezcla de ésteres grasos y glicerina, en presencia del hidróxido de sodio (NaOH) como catalizador. La reacción es la siguiente (Figura 6):

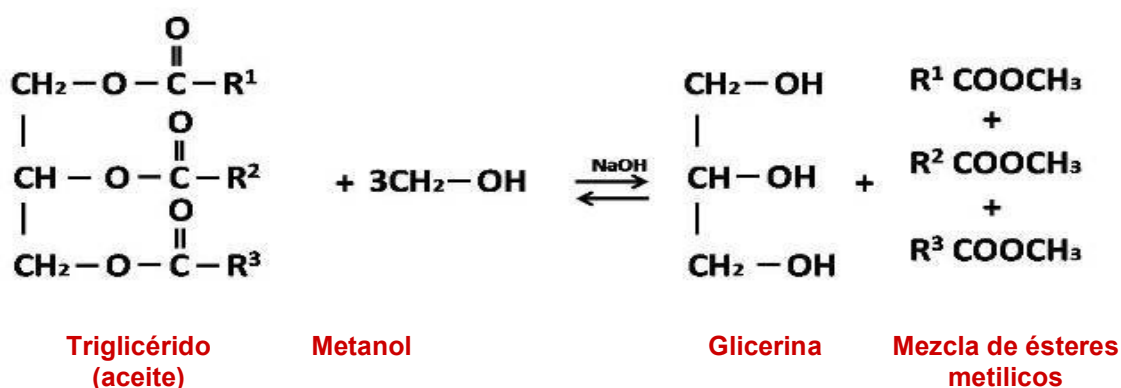


Figura 6 Transesterificación
Fuente. Ganesan *et al.* 2009 [59]

El mecanismo de la reacción (Figura 7) es que el triglicérido es convertido en un diglicérido, posteriormente a un monoglicperido, y por último en glicerina (glicerol); y en cada etapa reacciona con una de las tres moléculas de alcohol produciendo entonces una molécula de éster por cada glicérido convertido.

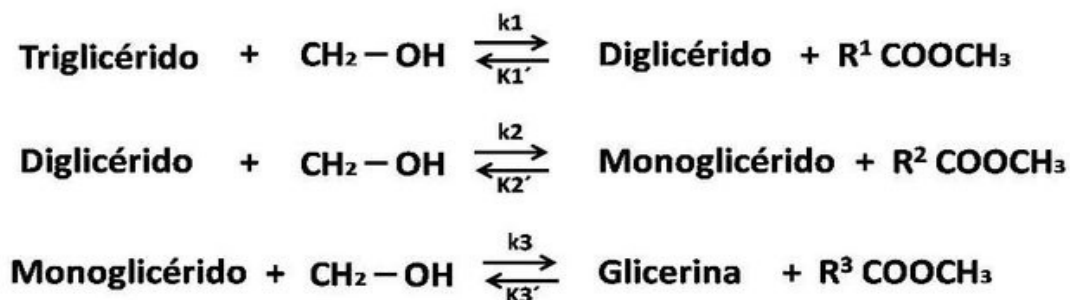


Figura 7 Mecanismo de la reacción de transesterificación

Fuente. Gansen et al. 2009 [59]

La reacción de transesterificación y el uso de biorreactores para el cultivo de microalgas, puede considerarse en la reducción de costos para la producción de biocombustibles aplicando la biotecnología [4]; la cual está basada en el desarrollo de tecnologías innovadoras que emplean organismos para la generación de un producto específico. En tal sentido, en los últimos años se han incrementado las investigaciones para este fin empleando una variedad de microorganismos; en este caso, microalgas [60 – 63] y es esta innovando con la aplicación de nuevos medios nutritivos.

La composición de los medios nutritivos ha sido estudiada para suplir, variar o añadir componentes que promuevan el crecimiento específico de alguna enzima que impulse el incremento en la producción de un metabolito deseado. El uso de materiales de desecho o de recursos reciclados ayudar a tener cultivos sostenibles para la producción de biomasa.

La orina es un desecho orgánico, el cual tiene un alto valor nutrimental para el cultivo de microalgas ya que tiene altas concentraciones de N y de P. [64],

menciona que una persona excreta alrededor de 25 – 35 g d⁻¹ de N y 2-2.5 g d⁻¹ de P, con variaciones de acuerdo con su dieta.

El orina como residuo orgánico ha sido utilizado en algunas investigaciones; sin embargo, no se tiene reportado como único nutriente ya que se le adicionan metales trazas o se utilizan medios de orina sintéticos. Jaatinen *et al.* (2016) reporta que trabajo con *Chlorella vulgaris*, usando diferentes medios nutritivos incluyendo orina humana en diferentes concentraciones más la adición de metales traza.

Por lo tanto, en este proyecto se busca el incremento en la producción de ácidos grasos de microalgas endémicas procedentes de un reservorio del estado de Nuevo León para la elaboración de biodiesel mediante el remplazo del medio de cultivo tradicional con el uso de orina humana como único nutriente.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

El uso de un residuo orgánico (orina), como medio nutritivo en el cultivo de una cepa nativa de *Chlorella sp.*, incrementa el rendimiento y mejora la calidad del perfil de los triacilgliceroles (TAG's), en comparación con el uso del medio nutritivo BG11.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivos generales

Diseñar y desarrollar un proceso de producción de biodiesel de 1.5 generación a partir de microalgas procedentes de una fuente de abastecimiento de agua potable del Estado de Nuevo León.

3.2.2 Objetivos específicos

- Realizar la identificación morfológica de las microalgas y determinar los parámetros de las cinéticas de crecimiento.
- Acondicionar un reactor con bajo consumo energético para la producción de biomasa microalgal.
- Maximizar la producción de biomasa mediante un diseño de experimentos, considerando como uno de los factores la fuente de luz.
- Caracterizar la biomasa microalgal cultivada.
- Extraer los ácidos grasos de la biomasa microalgal y caracterizarlos.
- Evaluar el rendimiento de la síntesis para la producción de biodiesel.

CAPÍTULO 4

METODOLOGÍA

4.1 Estrategia general del proyecto

A continuación, en la figura 8, se indica el planteamiento general del proyecto y un diagrama de flujo como síntesis de las diferentes etapas y su interrelación.

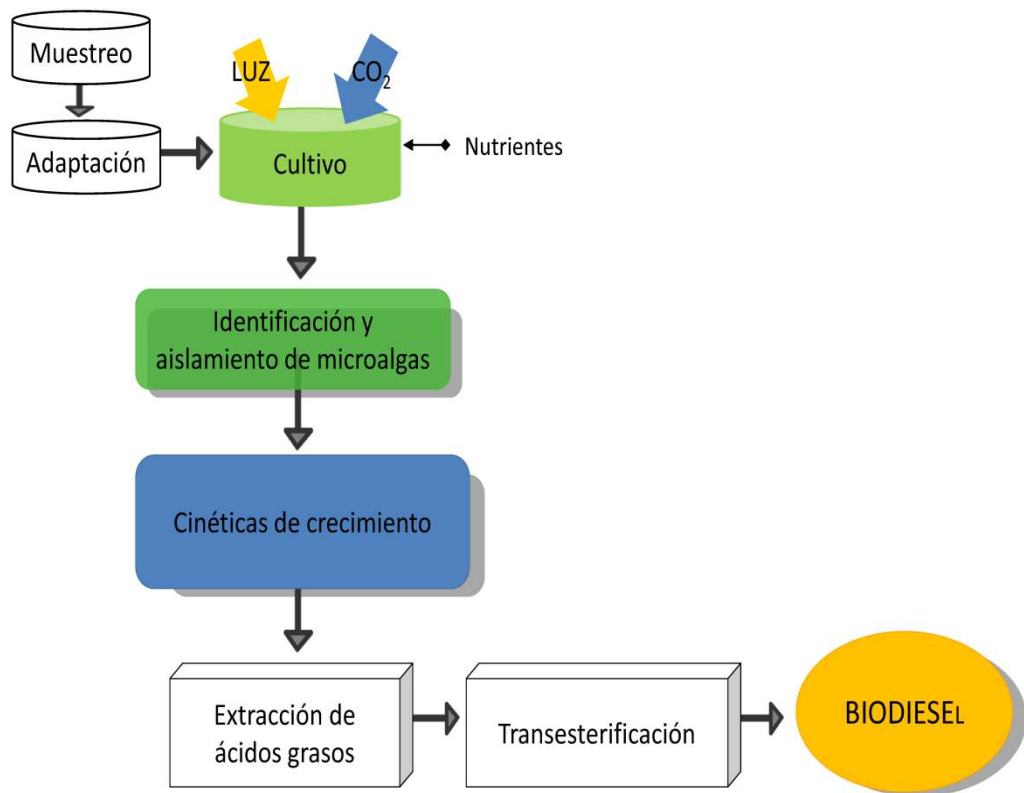


Figura 8 Diagrama de flujo general del procedimiento experimental del proyecto

4.2 Muestreo, caracterización del cuerpo de agua

Las microalgas fueron obtenidas de la Presa Rodrigo Gómez “La Boca”, cuerpo de agua dulce ubicado en el Estado de Nuevo León mediante un muestreo realizado el mes de enero de 2016. Se seccionaron tres puntos de muestro (M) de acuerdo con las disposiciones de los métodos estándar para el muestreo manual de plancton. Los muestreos se ubicaron cerca de los márgenes de las áreas de descarga y de las entradas de agua que puedan influir en la composición física y química del agua de la presa. Las coordenadas UTM de los puntos de muestreo se indican en la siguiente tabla para obtener una muestra homogénea del cuerpo de agua; a las cuales se les efectuaron mediciones de temperatura (NMX-AA-007-SCFI-2000), pH (AOAC, 1997. Método 973.41) y conductividad eléctrica (CE) (AOAC, 1997. Método 973.40) al momento del muestreo en campo.

El muestreo se realizó mediante una colecta directa en un contenedor de 20 litros el cual fue enjuagado con agua de la presa “La Boca” dos veces antes de la toma de muestra, para asegurar la eliminación de algún posible contaminante externo al cuerpo de agua dando cumplimiento a los métodos de muestreo publicados en el libro de Standard Methods, sección 9060 (Samples 2017). Posteriormente se trasladó en una hielera al laboratorio de ingeniería ambiental de la Facultad de Ingeniería Civil, UANL en donde se realizaron los siguientes análisis de acuerdo con la normatividad vigente: Nitrógeno Total Kjeldahl y amoniacal (NMX-AA-026-ACFI-2010); Demanda química de oxígeno (DQO) (NMX-AA-030/1-SCFI-2012) y

Fósforo total (NMX-AA-029-SCFI-2001); la muestra fue almacenada en un cuarto frío a 4°C en condiciones de obscuridad para evitar crecimiento celular.

Tabla. Coordenadas UTM de los puntos de muestreo

Punto de muestreo	Coordenadas
M1	25°24'29'' N 100°07'55'' W
M2	25°25'43'' N 100°08'47'' W
M3	25°25'41'' N 100°07'45'' W



Figura 9 Localización de los puntos de muestreo

Posteriormente se realizó la concentración de las muestras por medio de filtración, utilizando filtros de membrana de 0.45 μ de la marca Whatman, un embudo de filtración y una bomba de vacío marca Gast; se filtró 1 litro de muestra y el filtro fue colocado en agua destilada en un tubo de ensayo con capacidad de 10 mL; se dejó reposar por 24 hrs; después se agitó para desprender todos los organismos retenidos en él y utilizarlo como inóculo.

4.3 Identificación de las microalgas

Durante la fase de crecimiento del cultivo, se realizó la identificación de las microalgas procedentes de la presa Rodrigo Gómez "La Boca", mediante el uso de un microscopio óptico (SWIFT Optical M2251b Monocular) tomando una gota de muestra y colocándola sobre un portaobjetos para observarla y mediante el uso de diversas claves taxonómicas. De acuerdo con la clave taxonómica propuesta por Bungartz (2002) [66], la identificación se realizó de acuerdo con las características morfológicas de estos microorganismos (color del protoplasma, presencia/ausencia de cloroplastos con pirenoides, estado de células individuales o coloniales, y morfología globosa o filamentosa).

Este método de clasificación fue realizado de acuerdo con técnicas ya reportadas [46]. Posteriormente se utilizó el método Sedgewick Rafter (S-R) para el recuento celular. Se utilizaron pipetas para la toma de alícuotas de 1 mL de muestra, las cuales fueron depositadas en las celdas S-R. Una vez que se

asentaron las microalgas, el recuento se realizó mediante un método de conteo, utilizando un micrómetro de Whipple.

4.4 Técnicas de aislamiento

En cuanto al aislamiento, existen diversas técnicas para obtener cultivos monoespecíficos a partir de un cultivo polifilético, estos varían de acuerdo con las dimensiones de las microalgas, de su movilidad y su morfología. Con relación a esto último, los métodos empleados para aislar las microalgas de los cultivos obtenidos fueron: el método de aislamiento en placas de agar, el de diluciones seriadas (Figura 10) y el aislamiento mediante micropipetas con el uso de microscopio óptico [51].

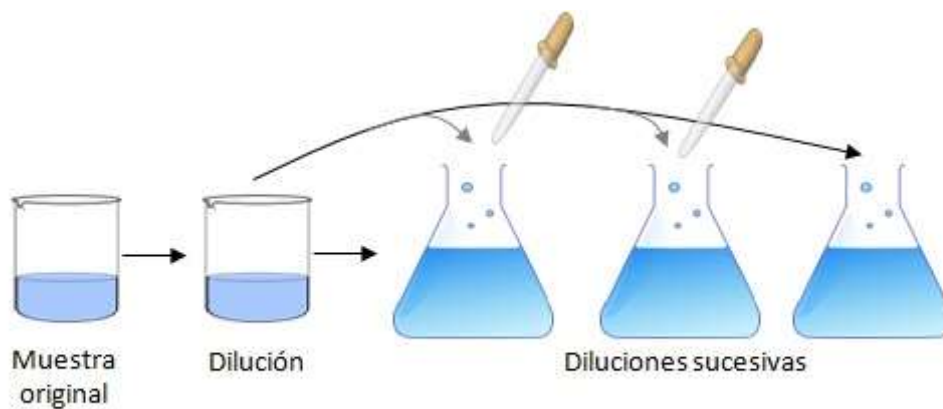


Figura 10 Técnica de aislamiento por dilución seriada
Fuente propia

Las muestras se diluyeron primero a 10^{-6} para ayudar en el proceso de aislamiento. Se usaron placas de Petri esterilizadas (100 x 15 mm) que contenían aproximadamente 40 mL de medio sólido BG11 (agar 15 g L^{-1}) para inocular con 1 mL de la muestra diluida. La muestra diluida se extendió uniformemente por la superficie. Las placas inoculadas se incubaron 14 días a 20-25 °C. Este método se repitió hasta que se observaron colonias uniformes y los organismos aislados se transfirieron a un medio BG11.

4.5 Cultivo y pruebas preliminares de crecimiento con un medio nutritivo básico (MEB)

Para iniciar el cultivo, se trabajó con la muestra colectada de los tres puntos de muestreo (M) obtenidos de la presa Rodrigo Gómez “La Boca”; se inoculo con 50 mL de microalgas y se adiciono 200 mL de un medio de nutrientes enriquecido básico, denominado MEB (fosfato monobásico de potasio, nitrato de sodio y sulfato de magnesio) en tres concentraciones (0.1 , 1 y 2 g L^{-1}) a 9 reactores cilíndricos tipo batch de 500 mL y 3 más fueron inoculados con la cepa, añadiéndoles únicamente 200 mL agua destilada; asimismo los 12 reactores fueron ubicados en un tren de 4 reactores (Figura 11); conectados a un sistema de aireación; el cual consistió en una bomba de aire marca Etile con capacidad total de 19 L/min con cuatro salidas (Correspondiéndole a cada reactor una salida de aire); para la conexión de salida a la bomba de aire, se utilizó una manguera flexible de silicón de 11/36” de diámetro interno, enlazada a un regulador de caudal para acuarios; consecutivamente la manguera de silicón se le insertó un

conector T para unir los reactores e inyectarles aire atmosférico a cada uno de ellos. Además, se adaptó una fuente de luz blanca de 23 watts en ciclos de 12 horas luz /oscuridad controlado por un temporizador (Sanelec Modelo 4345) por día por un periodo de 56 días; y la temperatura en los tratamientos se mantuvo bajo condiciones ambientales naturales, en donde la temperatura ambiental promedio registrada fue de 24°C, debido a que se trabajó en el interior del laboratorio de Ingeniería Ambiental de FIC, UANL.

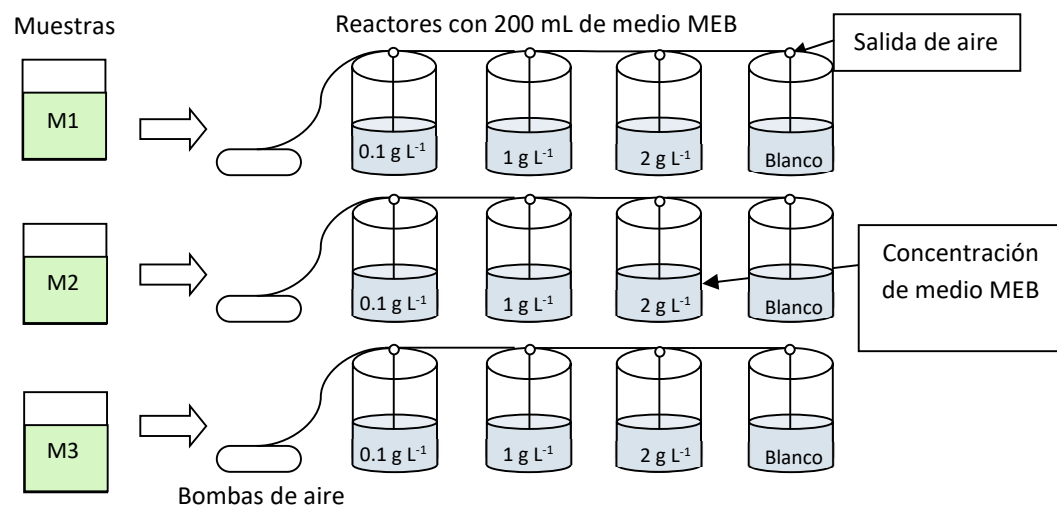


Figura 11 Esquema del cultivo de microalgas con medio MEB

4.6 Cuantificación de la biomasa base seca

Posteriormente para llevar un registro del crecimiento de las microalgas, se realizó una cuantificación de la biomasa generada por medio del método de peso seco el cual se describe a continuación:

4.6.1 Tratamiento previo

Para eliminar la interferencia en el filtro de vidrio, se realizó un pretratamiento, utilizando filtros de acuerdo con el método de sólidos suspendidos totales referido en Métodos Estándar para el análisis de aguas y aguas residuales. Para iniciar con el método, se utilizaron filtros del tipo Whatman de fibra de vidrio, con grado 934-AH, libres de aglomerantes, con capacidad de retención de partículas de 0.45 μm . Estos filtros se lavaron y secaron en una estufa (Shel Lab 1350FX) a 100°C durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron los filtros en un desecador y se dejaron enfriar durante aproximadamente 15 minutos a temperatura ambiente para registrar su peso.

4.6.2 Determinación de peso seco

Ya con los filtros tratados y listos para su uso, se procedió con la determinación; a través de monitoreos periódicos; en primera instancia se homogenizó el cultivo de microalgas y se filtraron 50 mL (cantidad recomendada cuando la densidad celular es mayor a 20×10^6 células por mililitro al ser *Chlorofíceas*) a través del filtro de fibra de vidrio preparado anteriormente, con una bomba de vacío (Gast) a una presión no mayor a 15 mm Hg [66].

Inmediatamente los filtros fueron colocados en cucharillas de papel aluminio y trasladados a la estufa por 6 horas a una temperatura de 65°C; transcurrido ese

lapso se acomodaron en un desecador por una hora y se pesaron en una balanza analítica (Sartorius BP2215).

Y se calculó el peso seco de la muestra con la siguiente ecuación:

$$\text{Peso seco (g L}^{-1}\text{)} = PFM - PF * R \quad \text{Ec. (1)}$$

donde:

PFM= Peso seco del filtro más la microalga

PF= Peso seco del filtro

R = La razón l/mL filtrados (1000/ x mL)

4.7 Evaluación de los factores determinantes que intervienen en un cultivo de microalgas.

4.7.1 Cinéticas de crecimiento empleando dos diferentes medios nutritivos para el cultivo de microalgas.

En el marco de lo anterior expuesto, se iniciaron las corridas por triplicado empleando la M₁ y el medio MEB en concentración de 1 g L⁻¹. Se utilizó un medio nutritivo adicional, el medio BG11 con la siguiente composición en g L⁻¹: NaNO₃ (6.2), K₂HPO₄ (0.04), MgSO₄ • 7H₂O (0.075), CaCl₂ • 2H₂O (0.036), ácido cítrico (0.006), citrato férrico de amonio (0.006), EDTA (sal de disodio) (0.001), Na₂CO₃ (0.02), H₃BO₃ (2.86), MnCl₂ • 4H₂O (1.81), ZnCl₂ • 7H₂O (0.22), CuSO₄ • 5H₂O (0.079), Na₂MoO₄ • 2H₂O (0.39) y CoCl₂ • 6H₂O (49.4), reportado para el crecimiento de microalgas *Cyanophytas* y *Chlorophytas* [66]. Para mejorar la tasa de crecimiento, la fotosíntesis y la producción de biomasa, se aplicó una mayor

salinidad al medio sustituyendo el sulfato de zinc con cloruro de zinc y el cloro de cobalto por nitrato de cobalto como se indica en literatura [67]. El pH promedio fue de 7.5 para estos dos medios. De acuerdo con los parámetros anteriormente descritos en cuanto al cultivo y medición con respecto a lo mencionado en los puntos 4.3 y 4.6. Esta cinética se trabajó inoculando un consorcio de microalgas y *Chlorella sp.* microalga aislada de la presa Rodrigo Gómez “La Boca”.

Para la evaluación de las cinéticas de crecimiento se utilizaron las siguientes formulas:

Velocidad de crecimiento:

$$\mu = \frac{\Delta y}{\Delta x} \quad \text{Ec. (2)}$$

donde:

μ = tasa o velocidad de crecimiento

Δy = cantidad de sustrato al inicio del cultivo

Δx = cantidad de sustrato en el tiempo

Tiempo de duplicación:

$$n = \frac{t}{td} \quad \text{Ec. (3)}$$

donde:

n = numero de generaciones

t = tiempo de la fase exponencial

td = tiempo de duplicación

Tiempo de generación:

$$g = \frac{\ln (N-N_0)}{t-t_0} \quad \text{Ec. (4)}$$

donde:

g= tiempo de generación

*N*₀= numero de microorganismos inicial

N= numero de microorganismos final

*t*₀=tiempo inicial

t = tiempo final

4.7.2 Caracterización de medios nutritivos MEB y BG11

Se realizó la caracterización de los medios nutritivos para determinar la concentración de sus macronutrientes esenciales (nitrógeno y fósforo); estos análisis se realizaron de acuerdo con lo establecido por las normas oficiales mexicanas. (NMX-AA-026-ACFI-2010, NMX-AA-029-SCFI-2001 respectivamente)

4.7.3 Cinéticas de crecimiento mediante un residuo orgánico

Después de lo anterior expuesto, se utilizó orina (un residuo orgánico) a modo de medio nutritivo; denominado como MOB; el cual fue recolectado conforme a el procedimiento de toma de muestras para urinocultivos emitido por PROLAB S.A. Laboratorio Clínico para instituciones hospitalarias; y se procedió a realizar los análisis descritos en el punto 4.7.1 para nitrógeno y fósforo.

La orina se recogió directamente usando frascos estériles de 3 empleados sanos masculinos y 3 femeninos del departamento de ingeniería ambiental de la UANL y se homogeneizó con un agitador magnético a 1000 rpm durante 10 minutos para su posterior análisis. La caracterización del medio MOB se realizó de acuerdo con la normativa vigente descrita en la caracterización de la muestra de agua. En seguida se tomó de referencia el resultado obtenido en la concentración de fósforo del medio nutritivo BG11, para la preparación del medio MOB, ya que forma parte de importantes intermedios metabólicos, lípidos y enzimas [67]. En este mismo sentido, se preparó el medio MOB en dos concentraciones de fósforo de 0.006 y 0.015 g L⁻¹ (MOB_L y MOB_H) realizando diluciones con agua destilada.

Posteriormente se prepararon 6 reactores tipo batch con capacidad de 500 mL, a los cuales se les añadió 450 mL de medio antes mencionado, y les fue suministrado aire atmosférico mediante una bomba con capacidad de 9 L; además se utilizó una estructura adaptada con luz led (roja, blanca y azul) en ciclos de 12 horas luz obscuridad en periodos de 12 días y finalmente se inoculó con 50 mL de *Chlorella sp.*

4.7.4 Relación biomasa/sustrato de un macronutriente (fósforo)

Los rendimientos se determinaron calculando la relación entre el producto obtenido y el sustrato consumido. Y el rendimiento celular se define a través del concepto de nutrientes limitantes. Un nutriente limitante es ese sustrato cuyo consumo controla la velocidad de producción de biomasa. A través de este

concepto de sustrato limitante, se puede definir el desempeño del proceso. Para determinar el porcentaje de sustrato consumido, fue necesario calcular el rendimiento biomasa/sustrato $Y_{x/s}$; el cual fue determinado por la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Ec. (5)}$$

donde:

S_0 = Cantidad de sustrato al inicio del cultivo

S = Cantidad de sustrato en el tiempo

t = Tiempo en el que se obtiene el número de células más elevado, reportando su resultado como g de células/ g de sustrato consumido.

4.7.5 Cinéticas de crecimiento a través de la dosificación de CO₂

A continuación, y de acuerdo con lo reportado [53], la dosificación de CO₂ es un factor determinante de crecimiento; por lo que se iniciaron nuevas corridas para la obtención de biomasa. Se trabajó con cuatro cultivos en reactores cilíndricos tipo batch de 500 mL. utilizando el medio nutritivo BG11; a dos de ellos se les inyectó CO₂ mezclado con aire atmosférico, inoculando a un reactor 50 mL del consorcio de microalgas y al otro 50 mL de *Chlorella sp.* (Ver figura 12); asimismo se trabajó a la par sin la adición de CO₂ con el consorcio y *Chlorella sp.* de acuerdo con el procedimiento referido en el punto 4.2.

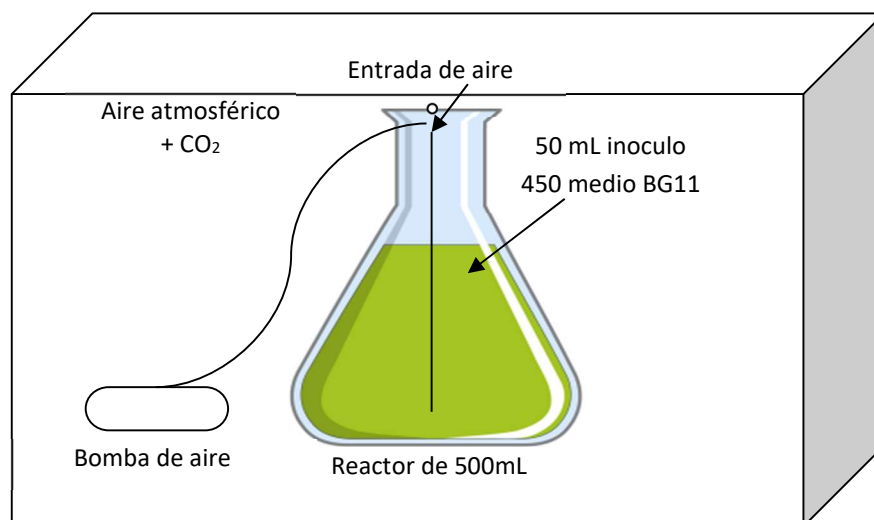


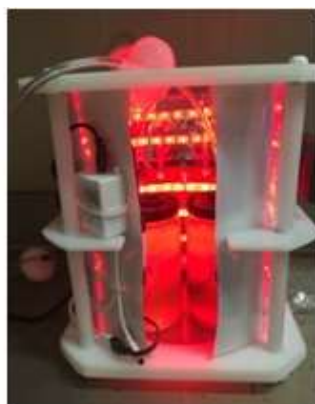
Figura 12 Esquema de la adición de CO_2 + aire atmosférico al cultivo del consorcio de microalgas y de *Chlorella sp.*

4.7.6 Cinética de crecimiento mediante la exposición del cultivo a tres longitudes de onda

Esta prueba de crecimiento se realizó conforme a lo descrito en el punto 4.3, destacando que se utilizaron seis reactores cilíndricos tipo batch de 500 mL. Los medios nutritivos utilizados en esta prueba fueron el MOB en concentración de 0.015 g L^{-1} y BG11 para cada longitud de onda. Estos reactores fueron inoculados tres con *Chlorella sp.* y tres con el consorcio de microalgas. La luz led fue administrada mediante estructuras con un interior circular, que contiene cinco tiras de LEDs multicolores de 0.045 W cada LED (Figura 13), lo que proporciona una incidencia total de luz en los cultivos. Las barras LEDs fueron alimentadas mediante un conversor de corriente a corriente continua. El LED azul, presentó una emisión aproximada de 435-500 nm, el rojo de 625 740 y el blanco comprende el rango total de colores, lo que reporta una emisión de 400 -700 nm.



azul ~ 435-500 nm



rojo ~ 625-740 nm



blanco ~ 400-700 nm

Figura 13 Estructura tipo cámara con diferentes longitudes de onda para incentivar el crecimiento de los cultivos de microalgas

4.7.7 Determinación de crecimiento por medio de espectrofotometría

La concentración de la biomasa microalgal influenciada por tres longitudes de onda fue evaluada a través de monitoreos diarios mediante densidad óptica. Se efectuaron extracciones de 10 mL del cultivo en agitación bajo condiciones asépticas, en donde 1 mL fue colocado en una celda de vidrio de la misma capacidad en el espectrofotómetro y después, los 9 mL restantes fueron utilizados en lecturas de pH, temperatura y oxígeno disuelto (Hanna Instruments). Asimismo, la absorbancia se determinó empleando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Helius Epsilon) a una longitud de onda de 750 nm para medir la densidad celular [68] y con las lecturas obtenidas, se elaboraron las curvas de crecimiento graficando las mediciones de absorbancia con respecto al tiempo.

4.7.8 Curva de calibración

Adicionalmente se realizó una curva de calibración para relacionar la turbidez provocada por el incremento en la concentración de la biomasa medida a λ de 750 nm con los resultados del cultivo de *Chlorella sp.* con el método de peso seco correspondiente a la toma de 50 mL de muestra cada 24 horas en condiciones de aireación constante con una bomba con 9 L y sometido a ciclos de luz led blanca de 12 horas Luz/obscuridad.

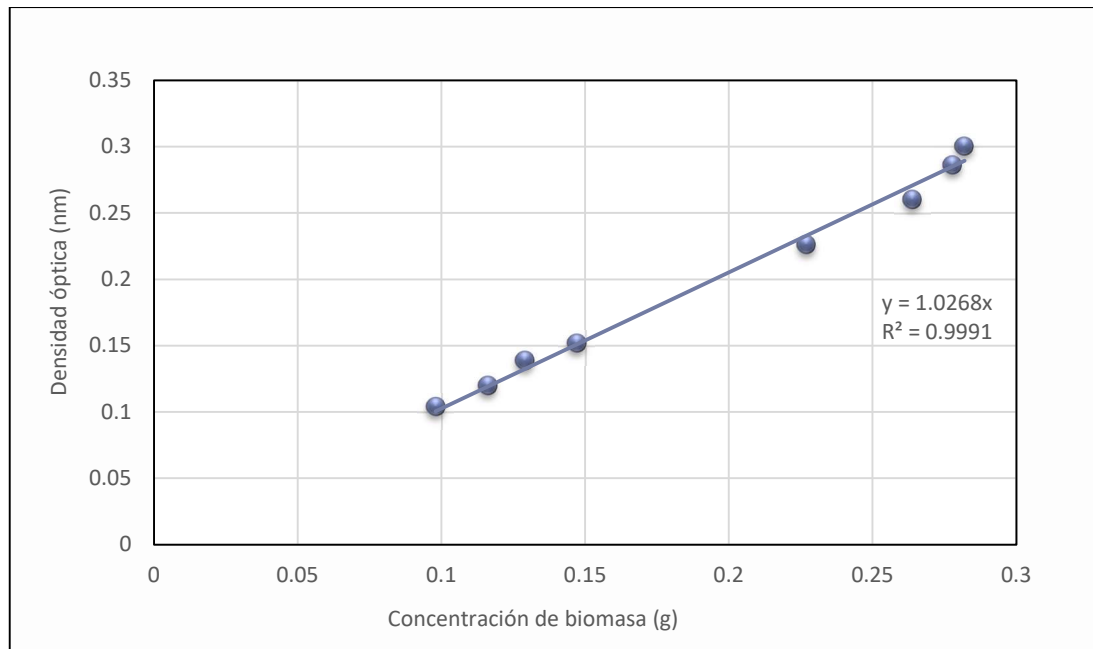


Figura 14 Curva de calibración que muestra la correspondencia entre la densidad óptica y la concentración (g de peso seco por litro) es lineal con un alto valor de R^2

4.8 Métodos de recuperación de la biomasa de microalgas

Entre los métodos de recuperación de biomasa microalgal, se pueden encontrar centrifugación, sedimentación, filtración, flotación y floculación [38, 69, 70, 71]; en esta investigación empleamos dos de los métodos anteriormente mencionados:

Para validar los datos obtenidos, utilizaremos la siguiente ecuación para determinar la cantidad de biomasa recuperada: (cosecha)

$$M = M_t - M_o \quad \text{Ec (6)}$$

donde:

M_t= Biomasa en el *t* y se calcula en el momento de la fase estacionaria en donde el número de células es más elevado

M₀= Biomasa del inóculo

4.8.1 Centrifugación

Este es un método ampliamente utilizado para la separación de biomasa debido a su eficiencia, se llevó a cabo agregando 25 mL de muestra líquida a un tubo de ensayo y enseguida se colocó dentro de una centrifuga (Thermo Scientific Heraeus Megafuge 8) cumpliendo dos ciclos de 10 minutos a 10,000 rpm y posteriormente se realizó un secado en un horno de convección a 60°C por 12 horas.

4.8.2 Sedimentación

Con respecto a este método, la sedimentación por gravedad es el método más común [69, 70, 71] pese a ser rudimentario; en este caso se utilizó un embudo decantador de 500 mL, en el cual se depositó un lote de cultivo de microalgas y se dejó reposar por 6 horas para realizar la primera separación de la muestra, tomando toda la biomasa sedimentada; repitiendo el mismo procedimiento a las 12, 18 y 24 horas, y posteriormente se realizó un secado en un horno de convección a 60°C por 12 horas.

4.9 Caracterización y determinación de componentes celulares en la biomasa microalgal

Todas las determinaciones mencionadas a continuación fueron realizadas por parte del Laboratorio de Alimentos, Medicamentos y Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas en cuatro muestras cultivadas bajo luz blanca, ciclos de 12 horas luz/obscuridad, inyección de aire atmosférico y en reactores cilíndricos tipo batch de 500 mL; cosechadas de acuerdo con lo mencionado en el punto 4.8 y secadas para obtener biomasa base seca correspondiente a los siguientes cultivos:

- a) *Chlorella sp.* cultivada en medio BG11.
- b) *Chlorella sp.* cultivada en medio MOB en concentración de 0.015 g L⁻¹.
- c) Consorcio de microalgas cultivada en medio BG11.
- d) Consorcio de microalgas cultivadas en medio MOB en concentración de 0.015 g L⁻¹.

4.9.1 Determinación de proteínas

En el caso de las proteínas, se trabajó de acuerdo con lo establecido en la NMX-F-608-NORMEX-2011; cuyo fundamento se basa en la descomposición de los compuestos de nitrógeno orgánico que por ebullición de la materia orgánica se oxidan para formar agua y bióxido de carbono. El ácido sulfúrico se transforma en SO₂, el cual reduce el material de nitrógeno a sulfato de amonio. El amonio se libera después de la adición de hidróxido de sodio y se destila recibiendo en una dilución al 2% de ácido bórico. Y se titula el nitrógeno amoniacal con una dilución valorada de ácido, cuya normalidad depende de la cantidad de nitrógeno contenido en la muestra y posteriormente el porcentaje de proteínas se obtiene multiplicando el porcentaje de nitrógeno obtenido por el factor correspondiente. Este método consta de las siguientes etapas:

$$N \text{ total } \frac{\text{Digestión en}}{\text{Ácido sulfurico}} (NH_4)_2SO_4/H_2SO_4 \xrightarrow[\text{de NaOH}]{\text{Destilar con exceso}} NH_3/\text{Ácido bórico}$$

4.9.2 Determinación de extracto etéreo

Esta prueba está fundamentada en la NMX-F-089-1978, en la cual se establece el procedimiento para la determinación de ácidos grasos (extracto etéreo) por el método Soxhlet, que consiste en una extracción cíclica de los componentes solubles en el éter que se encuentran. Para esta extracción se añadieron 6 mL

de metanol: cloroformo 2:1 (MetOH:CHCl₃) y se agitó durante un período de 2 min. Enseguida se añadieron 4 mL de CHCl₃ y 4 mL de agua destilada y se agitaron por 2 min; y se dejó reposar hasta que las fases orgánica y acuosa se separaron. La fase inferior (orgánica) se recogió con una pipeta Pasteur y se transfirió a un Erlenmeyer de 50 mL previamente pesado. Se realizó una segunda extracción añadiendo 4 mL de CHCl₃ y 4 mL de agua destilada y se agitaron durante dos minutos. Al observar la separación de fases, se tomó la fase interna y se colocó en el Erlenmeyer que tenía en la primera fase. El CHCl₃ se evaporó en un horno (Shel Lab) con una temperatura de 64.7°C, la grasa se midió por pérdida de peso de la muestra o por cantidad de muestra removida [62].

4.9.3 Determinación de cenizas

En cuanto a la determinación de ceniza, se trabajó de acuerdo con lo establecido en la NMX-F-607-NORMAX-2013, en la cual la materia seca, se carboniza o incinera y posteriormente se calcina a 500°C a 600°C para destruir a la materia orgánica de la misma permitiendo así la cuantificación de cenizas totales o minerales presentes (material inorgánico que no se volatiliza) [72, 73].

4.9.4 Determinación de humedad

Esté método se basa en que al añadir arena o grasa se incrementa la superficie de contacto y la circulación del aire de la muestra, favoreciendo así la evaporación durante el tratamiento térmico [74].

4.9.5 Determinación de carbohidratos

Con respecto a la determinación de carbohidratos; esta se realizó por diferencia.

4.10 Métodos de extracción de ácidos grasos en microalgas

El contenido total de lípidos se determina comúnmente por métodos de extracción, los más utilizados son a partir de disolventes orgánicos, sin embargo, también puede cuantificarse por métodos que no incluyen disolventes y por métodos instrumentales que se basan en propiedades físicas o químicas de los lípidos.

4.10.1 Métodos empleando solvente

En primera instancia, se utilizó el equipo Soxhlet, colocando 20 gr. de biomasa cosechada de un cultivo de *Chlorella sp.* en un cartucho de celulosa, teniendo precaución de estar bien tapado para evitar arrastre del material, y este se colocó en el compartimiento de muestra en el equipo; después se añadió metanol como solvente a un matraz redondo y se comenzó la etapa de calentamiento, regulando el caudal de agua del reflujo. El solvente una vez que alcanza su temperatura de ebullición, se evapora y llega al refrigerante condensándose y cayendo al compartimiento del cartucho de muestra iniciando la separación de los compuestos; estos ciclos de extracción se realizaron por un lapso de 12 horas;

posteriormente, se retira el cartucho con la muestra. Enseguida, se vuelve a colocar el dispositivo para calentar y separar el solvente del aceite extraído; cuando la cantidad de solvente en el matraz es mínima, este se colocó en una estufa para eliminar el resto del solvente se traslada a un desecador y se deja enfriar [34, 49, 72].

Una vez frío, el matraz es pesado en una balanza analítica y se procede a calcular el porcentaje de grasa mediante la siguiente expresión:

$$G (\%) = \frac{m_2 - m_1}{M} 100 \quad \text{Ec (7)}$$

donde:

m₁ = Masa en gramos del matraz de fondo redondo vacío

m₂ = Masa en gramos del matraz de fondo redondo con grasa

M = Peso de la muestra en gramos

Este método se realizó de la misma forma utilizando dos diferentes solventes más (hexano y cloroformo).

Posteriormente se trabajó con el método de extracción y destilación simultánea, mediante el uso de un equipo Clevenger, con cloroformo como solvente y 20 g de *Chlorella* sp. en base seca, con un tiempo de extracción de 1 hora a una temperatura de 61°C.

4.10.2 Confirmación de lisis celular mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM)

Esta técnica brinda información directa de la morfología del espécimen a analizar. El SEM es capaz de producir imágenes de alta resolución (-1nm) de la superficie evaluada. Este quipo en lugar de un haz de luz utiliza un haz de electrones para genera una imagen clara de la superficie de sólidos orgánicos e inorgánicos. Debido al haz de electrones es que algunos materiales necesitan ser recubiertos con algún compuesto que sea conductor, en caso de que el material no lo sea; los recubrimientos que se usan es el carbón o delgadas capaz de algún metal como lo es el oro.

El SEM se utilizó para confirmar la lisis celular para la recuperación de los ácidos grasos contenidos intracelularmente en *Chlorella sp.* Y consistió en el recubrimiento (oro-paladio) celular de la biomasa con el equipo modelo Denton Vacuum-Desk V; la muestra seca, fue colocada en una cámara de vacío; la cual, al llegar a cierta presión, detecta la condición óptima para aplicar el recubrimiento. Posterior a esto, se procedió al análisis de las muestras de biomasa, para lo cual se utilizó el microscopio electrónico de barrido JEOL – JSM-6510LV.

Las muestras a analizadas fueron dos:

a) *Chlorella sp.* – Muestra de biomasa extraída de un medio de cultivo.

b) *Chlorella sp.*- Muestra de biomasa después del procedimiento de extracción de ácidos grasos con solventes. (Cloroformo y metanol).

4.10.3 Perfil de ácidos grasos

Otro análisis realizado fue el perfil de ácidos grasos de acuerdo con el Método Oficial AOAC 969.33 y la preparación de los ésteres metílicos por el método de trifloruro de boro, en el cual se saponificaron los glicéridos y fosfolípidos y se liberaron y esterificaron los ácidos grasos en presencia de un catalizador de BF₃ para su análisis en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (Hewlett Packard 5890). Los estándares preparados fueron de la marca Sigma (mezcla FAME de 37 componentes). Se inyectó por triplicado de 0.1 a 20. µL de una solución de 5 al 10% de los ésteres metílicos y a continuación se añadió 1 µL también en triplicado de la solución estándar.

Enseguida se identificaron las muestras mediante el método cromatográfico que permite la separación de patrones en forma de ésteres de los ácidos grasos; esta identificación se realizó por coincidencia del tiempo de retención de los picos aparecidos en la muestra con los patrones disponibles (tras la previa preparación de la muestra). Posteriormente la cuantificación se basa en la adición de patrón interno durante el proceso de preparación de la muestra y aplicando el factor de respuesta de este patrón interno a los ácidos grasos a cuantificar.

4.11 Transesterificación

Con el aceite obtenido a partir de la biomasa microalgal, se procedió a realizar la transesterificación en régimen discontinuo, que consiste en la reacción de un triéster de glicérido (triglicéridos) con un alcohol para formar metil éster y glicerol. El volumen del aceite a procesar se mezcló con una preparación de metóxido de sodio preparada agregando metanol y NaOH hasta disolverlos completamente con la ayuda de un agitador magnético.

Enseguida se colocó la mezcla de aceite y metóxido en un vaso de precipitado y se calentó hasta llegar a 55°C, cuidando de mantener esta temperatura hasta el final agitándolo a 500 rpm por un periodo de 1.5 a 2 horas, observando la separación de los ácidos grasos de la glicerina; en ese momento se transfirió a un decantador y se dejó reposar por un lapso de 12 horas para observar claramente la separación de fases; por último se separó lo decantado del sobrenadante y se realizaron dos lavados con la finalidad de separar impurezas.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUCIONES

5.1 Muestreo y caracterización del cuerpo de agua

La concentración de nutrientes (N, P) en la muestra de agua obtenida de la represa Rodrigo Gómez "La Boca", registró valores de 0.004 g L⁻¹ de nitrógeno total y 0.00075 g L⁻¹ de fósforo con un pH alcalino (7.6-7.7) y la temperatura oscila entre 12-18 °C. En este estudio, las concentraciones de N y P indican los bajos niveles de estos macronutrientes presentes en la presa al momento del muestreo, lo que influye, pero no interfiere con la presencia de microalgas en el cuerpo de agua. Sin embargo, muestra el alto grado de supervivencia de estos microorganismos al déficit y abundancia de nutrientes. La variación de nutrientes afecta el hábitat de las microalgas, induciendo la competencia por los nutrientes, lo que provoca estrés ambiental e influye en la distribución y abundancia de los diferentes géneros [75, 76, 77, 78].

Tabla. Caracterización de la presa Rodrigo Gómez "La Boca"

	Unidad	M1	Desvest	M2	Desvest	M3	Desvest	Promedio
pH	Unidades	7.73	0.27	7.78	0.21	7.82	0.18	7.7766
Conductividad Eléctrica	µS/cm	425	16.87	415	10.80	407	3.39	415.666
Nitrógeno total Kjeldahl	g L ⁻¹	0.0004	0.0004	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003
Nitrógeno proteico (orgánico)	g L ⁻¹	0.0003	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002	0.0001	0.0002
Nitrógeno amoniacal	g L ⁻¹	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Demanda Química de Oxígeno	g L ⁻¹	0.038	0.027	0.019	0.014	0.029	0.015	0.0286
Fósforo total	g L ⁻¹	0.0007	0.0001	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0005

Estas variaciones se obtienen como consecuencia de las temporadas de lluvias y las actividades económicas que se desarrollan en el cuerpo de agua y en sus alrededores; tales como: actividades acuáticas, domésticas, agrícolas e industriales que se realizan, ya que es uno de los cuerpos de agua más representativos del estado. Estas actividades provocan eutrofización (contaminación orgánica e inorgánica de una masa de agua), promoviendo alteraciones en la disponibilidad de nutrientes para las microalgas. En un estudio realizado en China, se menciona que la mayoría de los lagos urbanos son hipertróficos por sus altas concentraciones de N y P, con un promedio de 5.38 y 0.49 g L⁻¹ respectivamente [75]. Aunado a esto, la competencia, perturbación y las respuestas al estrés ambiental, son procesos importantes que determinan su distribución y abundancia [76, 77, 78].

5.2 Identificación de las microalgas

De los muestreos realizados se obtuvo un consorcio de microalgas que tiene una composición de: 25 géneros, 17 familias y 4 divisiones de microalgas; siendo *Chlorophyta* la que presentó mayor densidad celular (10 cel mL^{-1} por muestra). La variación natural entre los grupos de microalgas y el factor de influencia que se observaron las condiciones climáticas, así como la capacidad de adaptación de la división *Chlorophyta*; además, esta división tiene el potencial de ser considerada como materia prima en condiciones variables [79].

Se utilizaron imágenes de microscopía para identificar los géneros de microalgas detectadas en la muestra. Estos géneros de microalgas tienen cualidades particulares, ya que la división, *Chlorophyta* tiene como característica principal la presencia de clorofila a y b, que son los pigmentos que les dan su característico color verde [80]. Entre los géneros presentes en la muestra se encuentran *Cosmarium sp.*, *Chlorella sp.*, *Staurostrum sp.*, *Coleastrum sp.*, *Pediastrum sp.* entre otros.

En las figuras 15 y 16 se muestran imágenes de alguno de los géneros encontrados con más frecuencia en el cuerpo de agua, identificados principalmente por su morfología y características taxonómicas.

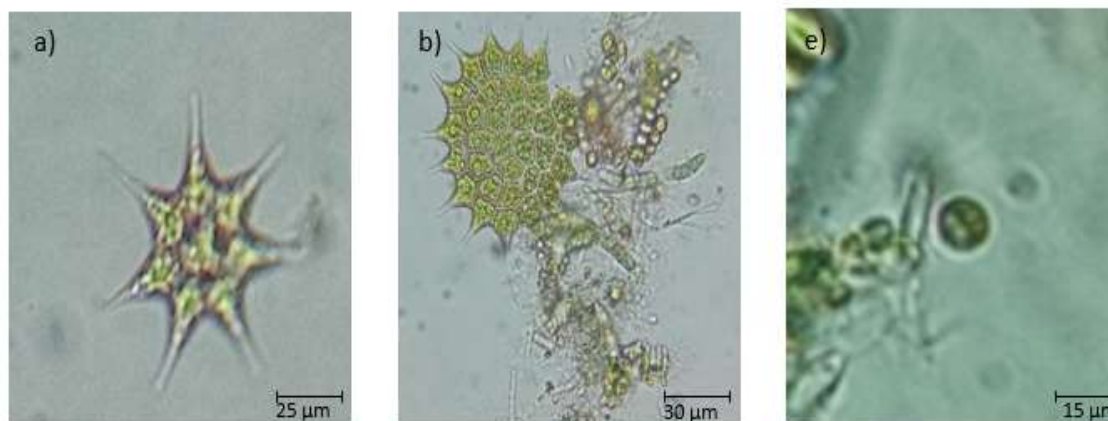


Figura 15 Microalgas de la Presa Rodrigo Gómez "La Boca".
a y b-*Pedastrum* sp. c) *Coleastrum* sp.

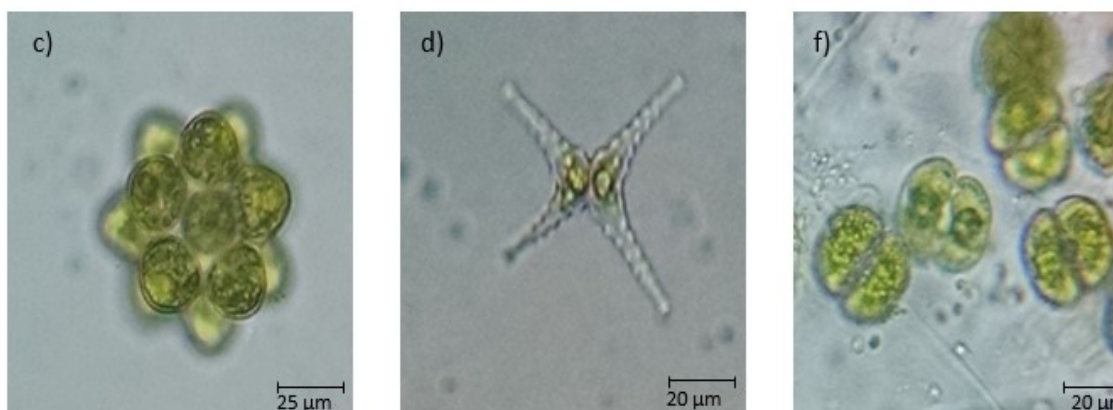


Figura 16 Microalgas de la presa Rodrigo Gómez "La Boca"
d) *Staurastrum* sp. e) *Chlorella* sp. f) *Cosmarium* sp.

5.3 Técnicas de aislamiento

En cuanto al aislamiento de microalgas se lograron resultados utilizando el método de dilución seriada, mediante la cual, se aisló *Chlorella* sp. (Figura 17) género de la familia de *Chlorophyta*. Esta microalga fue seleccionada y aislada debido a su capacidad para producir ácidos grasos (Gouveia y Oliveira, 2009). Se ha demostrado que *Chlorella* sp. es capaz de adaptarse a un amplio rango de

temperaturas, lo que aporta ventajas durante el proceso de producción de biomasa de microalgas (MBP). Posteriormente, la producción de MBP y ácidos grasos de los consorcios y *Chlorella sp.* fueron analizados y caracterizados más a fondo. Su árbol filogenético es el siguiente:

Dominio: Eukarya
Phylum: Viridiplatae
Division: *Chlorophyta*
Clase: *Trebouxiophyceae*
Orden: *Chlorellales*
Familia: *Chlorellaceae*
Género: *Chlorella*

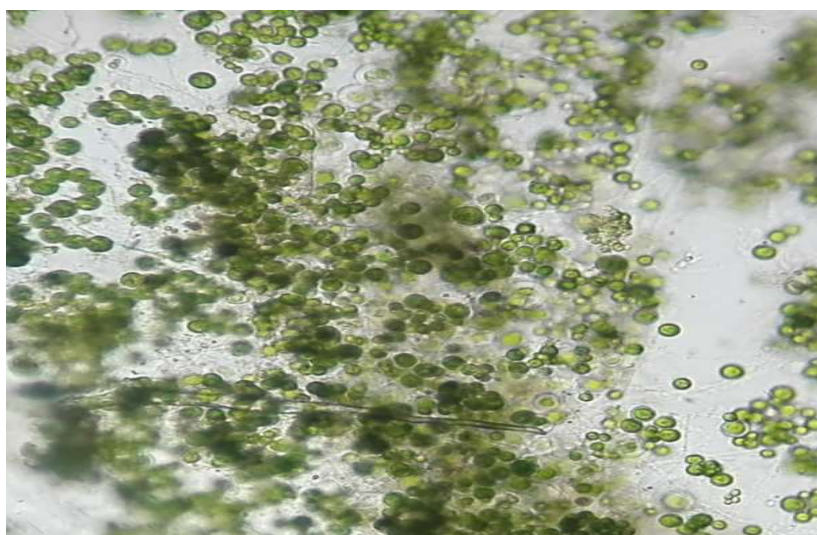


Figura 17 Microalga nativa de la presa Rodrigo Gómez "La Boca" del género Chlorella sp.

5.4 Cultivo y pruebas preliminares de crecimiento con un medio nutritivo básico (MEB)

A las microalgas caracterizadas, se les realizó pruebas preliminares para determinar su crecimiento, iniciando con su adaptación y para activarlas. Se

utilizó el medio MEB para dotarles de los nutrientes para incentivar su capacidad de reproducirse y por lo tanto generar mayor concentración de biomasa.

Las figuras 18 y 19 exponen que la fase de latencia culminó para las muestras con menor o nula concentración de nutrientes en un periodo de dos semanas y media. En cuanto a las muestras cultivadas en el medio MEB con concentración de 1 y 2 g L⁻¹ (Figuras 20 y 21), la fase de latencia terminó en un periodo de una semana y media. Posteriormente la fase exponencial presentó una duración de 4 y 5 semanas respectivamente.

En lo que concierne a las concentraciones de nutrientes, se obtuvo una densidad celular máxima en la M₁ en concentración de 1 g L⁻¹ (4,760 cel mL⁻¹), presentando un incremento en el conteo celular del 83% con respecto a los resultados obtenidos con la concentración de 2 g L⁻¹ registrando una menor densidad celular (801 cel mL⁻¹).

En cuanto a los resultados obtenidos en el blanco (Tabla Resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos de muestreo y un blanco), es importante resaltar que presentó duplicación celular únicamente con la presencia de luz y la inyección de aire atmosférico y sin la adicción de nutrientes su densidad celular total fue de 1,886 cel mL⁻¹; alcanzo lo que representa un incremento del 57% en referencia a la concentración de 2 g L⁻¹ que registró un índice menor (Figura 21). El pH inicio con un valor promedio de 8 y continuó elevándose el valor hasta la sexta semana, en la cual alcanzo un valor promedio de 10.3 unidades, lo que representa una alza de 2.3 unidades.

Esto confirma que la perturbación en el cultivo de estos microorganismos modifica los patrones naturales de crecimiento [70, 71]; es decir, las condiciones ambientales (temperatura, pH y concentración de nutrientes) intervienen con las actividades metabólicas de la célula, inhibiendo su crecimiento o incentivando su crecimiento.

Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos de muestreo y un blanco

	M1	M2	M3
Promedio de concentración celular (mL^{-1})	1,886	1,287	559
Velocidad específica de crecimiento (cel mL^{-1})	0.515	0.547	0.519
Tiempo de duplicación (hr)	0.693	0.693	0.693
Tiempo de generación (Semanas)	1.345	1.267	1.335
R^2	0.935	0.962	0.928
pH promedio		8.86 \pm 0.03	
Desvest	1.306	1.367	1.321

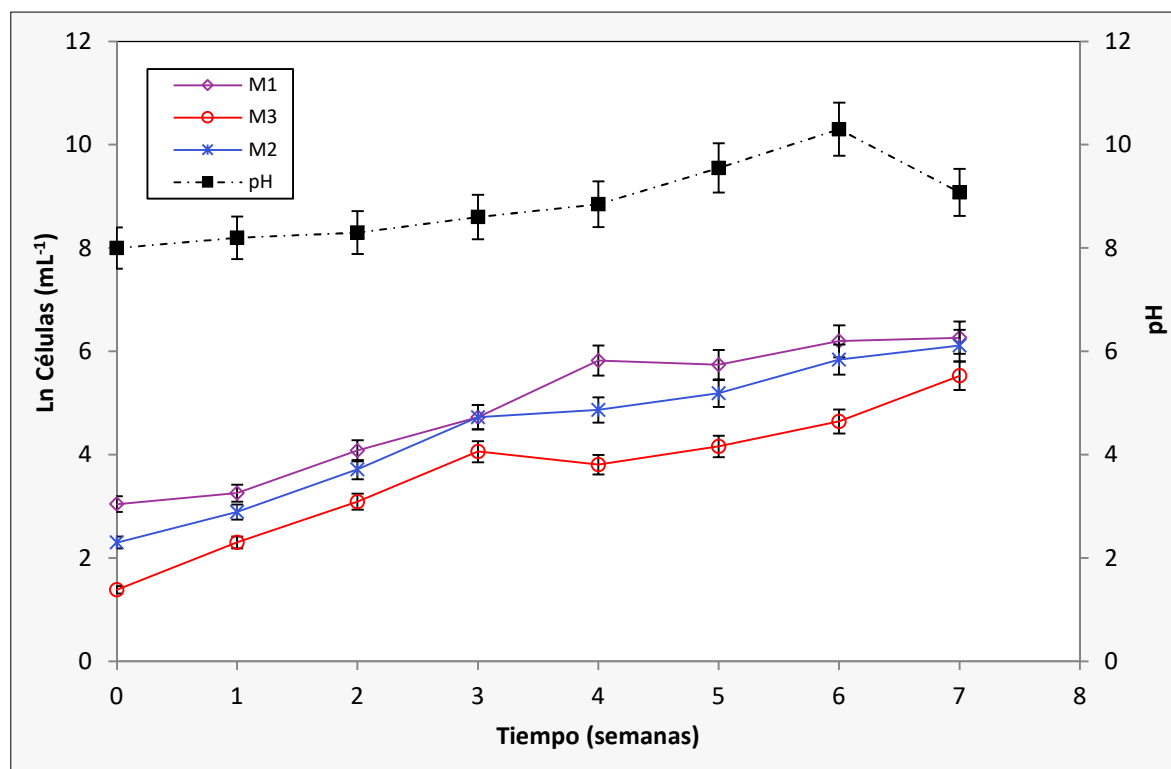


Figura 18. Prueba preliminar de crecimiento mediante un blanco

En relación con el MEB en concentración 0.1 g L^{-1} (Tabla de resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos muestreados mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentraciones del 0.1 g L^{-1}), podemos observar que las tres muestras refieren un crecimiento similar hasta la tercer semana, en donde, la duplicación celular de las muestras M_1 y M_2 se incrementa en un 52% con relación a la M_3 ; siguiendo esta tendencia la M_1 reportó una densidad celular de $1,193 \text{ cel mL}^{-1}$, lo que representa un crecimiento del 85% en relación con el valor máximo de M_3 .

Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento de los tres puntos muestreados mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 0.1 g L^{-1}

	M1	M2	M3
Promedio de concentración celular (mL^{-1})	3,203	2,236	443
Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	0.763	0.644	0.512
Tiempo de duplicación (hr)	0.693	0.693	0.693
Tiempo de generación (semanas^{-1})	0.908	1.076	1.353
R^2	0.960	0.936	0.853
pH promedio		8.765 \pm 0.00	
Desvest	1.909	1.631	1.359

El pH al inicio del cultivo fue de 8 unidades, registrando una variación de 1.9, presentando un pico al llegar a la sexta semana de cultivo. En los días posteriores el valor del pH decayó hasta obtener un valor de 9.5.(Figura 19).

Con relación a la concentración de 1 g L^{-1} de MEB (Tabla Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 1 g L^{-1}), observamos que la muestra M_1 presentó el mayor índice de crecimiento

con relación al blanco y las concentraciones de 0.1 y 2 g L⁻¹. Esta concentración registró un promedio de crecimiento de 3,046 cel mL⁻¹ en las tres muestras; lo que representa un aumento en la densidad celular de 59, 35.6 y 76% respectivamente.

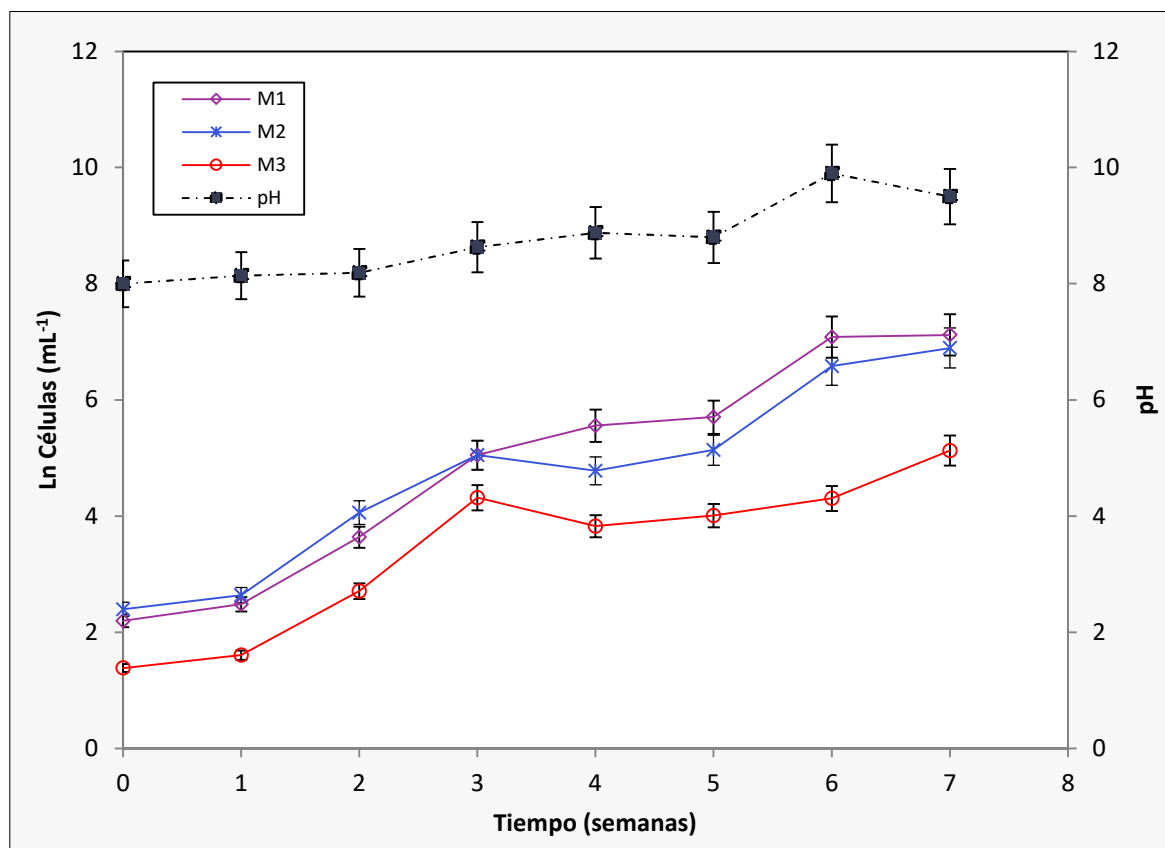


Figura 19 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 0.1 g L⁻¹

En cuanto al pH, se elevó 1.6 unidades durante la cinética de crecimiento que comprendió del día 0 al día 49 (séptima semana); es importante resaltar el aumento gradual registrado, ya que de la semana 1 a la 4 su incremento fue de 0.78 unidades, y entre la semana 5 y 6 se presentó un pico de 0.68 unidades, el

cual duplico el valor en una semana; esto se relaciona con el incremento celular registrado en el mismo periodo ($1,405 \text{ cel mL}^{-1}$).

Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 1 g L^{-1}

	M1	M2	M3
Promedio de concentración celular (mL^{-1})	4,760	2,788	1,590
Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	0.766	0.606	0.737
Tiempo de duplicación (hr)	0.693	50.693	0.693
Tiempo de generación (Semanas^{-1})	0.904	1.143	0.940
R^2	0.983	0.950	0.972
pH promedio		8.921 \pm 0.00	
Desvest	1.892	1.522	1.831

De acuerdo con los resultados obtenidos, el promedio de pH en las 4 muestras analizadas es de 8.2 a 8.78, mismo que es referido en literatura, ya que se menciona que un rango óptimo de pH para un cultivo está entre 7 y 9 unidades. Por otra parte, algunos autores coinciden en que el crecimiento de microalgas es óptimo en un pH de 7.5 [81, 82, 83], por lo que son utilizadas soluciones amortiguadoras en los medios con la finalidad de mantener o ajustar el pH del medio.

Opuesto a lo antes mencionado, el pH registrado en los 4 cultivos presentó un comportamiento natural, debido a que este se incrementa conforme la edad del cultivo; esto es debido a la acumulación de minerales y a la oxidación de los nutrientes. Soportando lo reportado en esta investigación, Alyabyev demostró, que *Chlorella vulgaris*, expuesta a pH extremos (alcalinos o ácidos) incrementan la producción de calor y tareas de respiración, contrario a lo observado con una microalga marítima *Dunaliella sp.* [84].

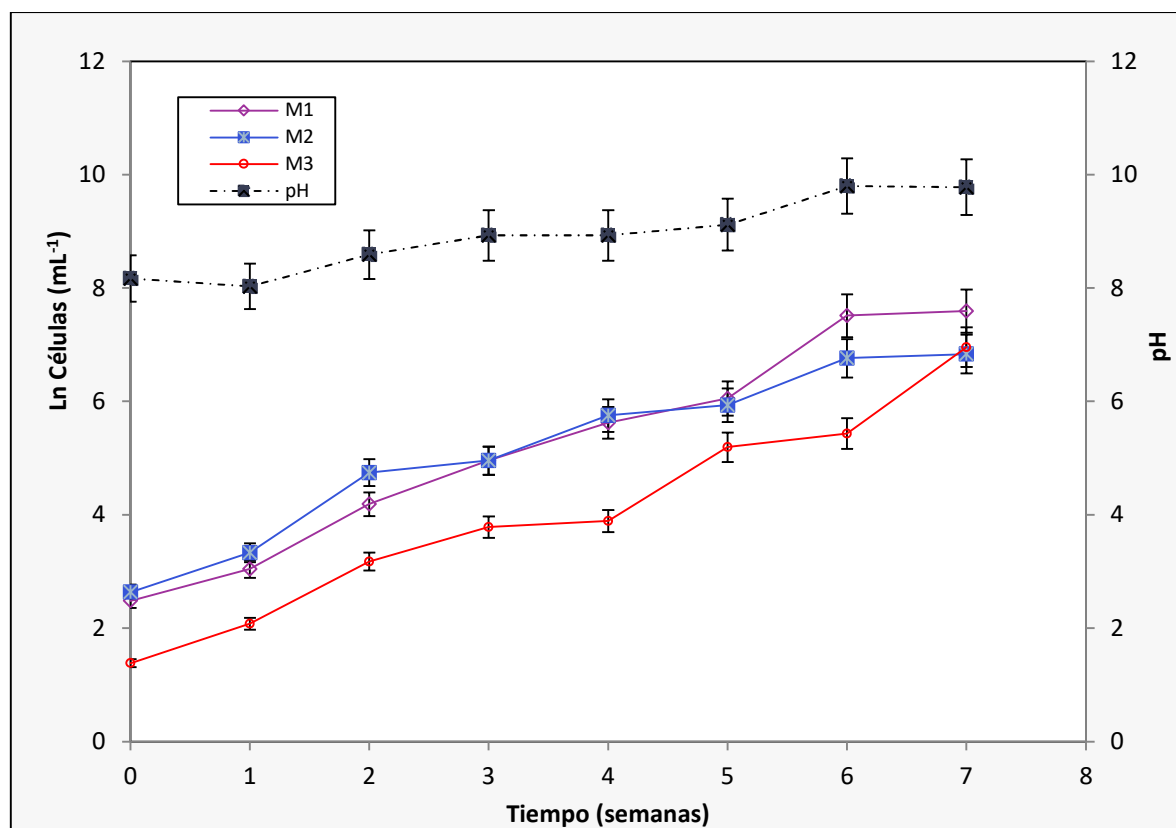


Figura 20 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 1 g L⁻¹

Por último, la concentración de 2 g L⁻¹ (Figura 20 y Tabla Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 2 g L⁻¹) produjo la menor densidad celular y los valores más bajos de pH; esto se vio reflejado en el crecimiento, ya que su mayor producción celular a la séptima semana fue de 786 cel mL⁻¹; comparándolo con los resultados de la concentración de 1 g L⁻¹ que registró un conteo celular de 1,987 cel mL⁻¹ representa un déficit de 39.5%.

Tabla. Resultados de la prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio MEB en concentración de 2 g L^{-1}

	M1	M2	M3
Promedio de concentración celular (mL^{-1})	2,591	2,323	1,166
Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	0.611	0.604	0.641
Tiempo de duplicación (hr)	0.693	0.693	0.693
Tiempo de generación (Semanas)	1.134	1.147	1.081
R^2	0.932	0.881	0.936
pH promedio	8.60 ± 0.00		
Desvest	1.551	1.575	1.624

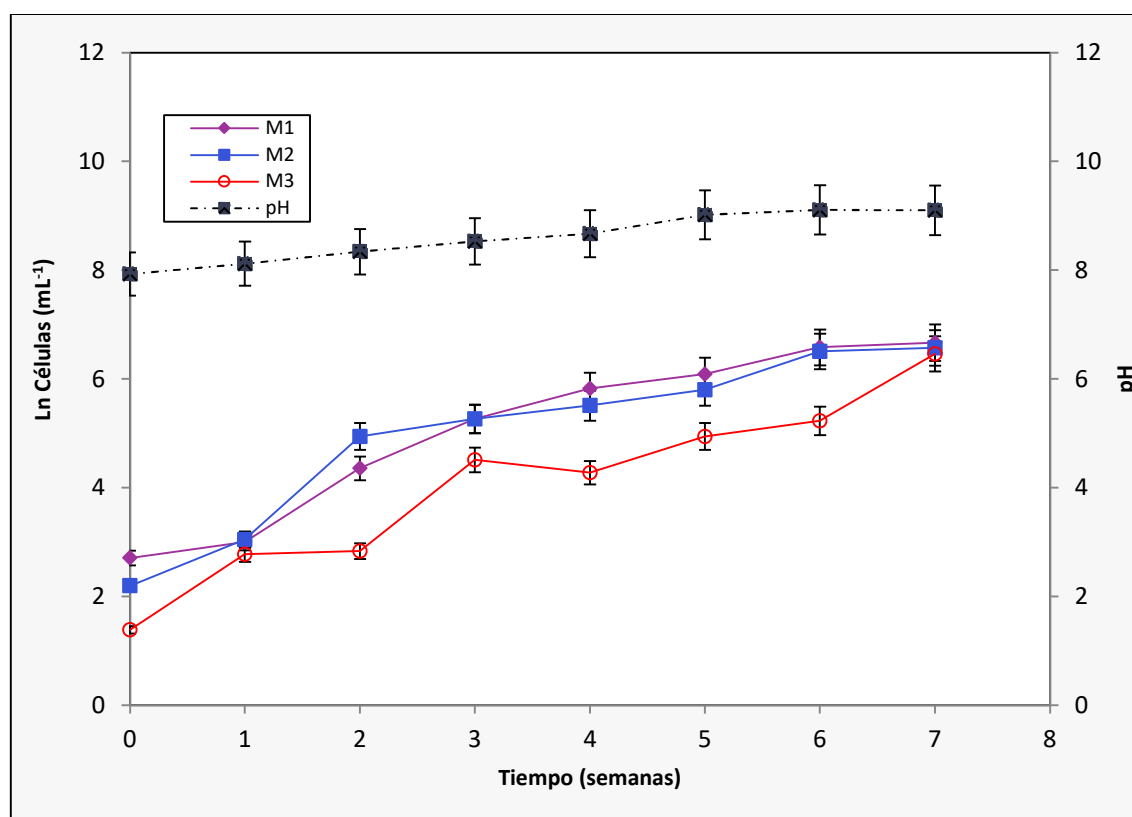


Figura 21 Prueba preliminar de crecimiento mediante el uso del medio nutritivo MEB en concentración de 2 g L^{-1}

De acuerdo con el comportamiento observado en estas pruebas preliminares, la respuesta obtenida de crecimiento mediante la exposición a diferentes concentraciones de nitratos, fosfatos y sulfatos, no corresponden al supuesto de:

a mayor concentración de nutrientes mayor crecimiento (no existe limitación de nutrientes).

Las algas en general requieren nutrimentos en disolución, si bien los nitratos y fosfatos son dos nutrientes de importancia, es necesaria la presencia de micronutrientes para cubrir las necesidades del microorganismo [85]. Por otra parte, se debe considerar el objetivo del cultivo, es decir, si la finalidad es una alta productividad de biomasa, la composición del medio de cultivo debe contener altas concentraciones de nitratos y fosfatos, debido a que son esenciales para su crecimiento [86].

5.5 Evaluación de los factores determinantes que intervienen en un cultivo de microalgas.

5.5.1 Cinéticas de crecimiento empleando dos diferentes medios nutritivos para el cultivo de microalgas.

Con base a los resultados obtenidos en la sección 5.4, en donde el crecimiento celular con el medio MEB en concentración de 1 g L^{-1} presentó un incremento del 83% con respecto al cultivo en concentración de 2 g L^{-1} ; por lo tanto, se seleccionó la muestra M_1 para la ejecución de las determinaciones posteriores en concentración de 1 g L^{-1} de MEB para la realización de las pruebas correspondientes.

Percibimos que el incremento en la biomasa con BG11 fue 5.8% veces mayor en el consorcio con respecto a *Chlorella sp.*; en general, esto representa un aumento promedio de 10.18% (Tabla Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* y un consorcio de microalgas con dos medios nutritivos, fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, bajo luz blanca fluorescente).

Tabla. Cinética de crecimiento de Chlorella sp. y un consorcio de microalgas con dos medios nutritivos, fotoperiodo de 12 horas luz/oscuridad, bajo luz blanca fluorescente

	<i>Chlorella sp.</i>		Consortio	
	MEB	BG11	MEB	BG11
Velocidad específica de crecimiento (d^{-1})	0.002	0.023	0.019	0.005
Productividad volumétrica ($g\ L^{-1}\ d^{-1}$)	0.001	0.026	0.004	0.024
Densidad de biomasa ($g\ L^{-1}$)	0.098	0.602	0.140	0.561
R^2	0.824	0.953	0.866	0.894
Desvest	0.310	0.993	5.717	2.820

Analizando la figura 22, observamos que la concentración inicial de *Chlorella sp.* fue de $0.5\ g\ L^{-1}$ tanto en MEB como en BG11; En 24 horas la duplicación celular en BG11, se incrementó un 75% con respecto al MEB alcanzando la concentración de biomasa máxima al día 22 con $0.602\ g\ L^{-1}$; contrario al MEB, que registro su mayor peso o densidad celular al día 18 ($0.098\ g\ L^{-1}$) y posteriormente disminuyo a $0.016\ g\ L^{-1}$.

Estos resultados se atribuyen a la composición del medio BG11; esto es de acuerdo con un estudio publicado por Fábregas *et al.* (1998) [87], en el que reporta la reacción de la microalga *Haematococcus pluvialis* por la deficiencia de N y Mg en su cultivo. En esta investigación, se reportó que la microalga al tener

una deficiencia de N y Mg en su cultivo incrementa su densidad celular y la acumulación de pigmentos se ve favorecida [87].

Con referencia a la velocidad específica de crecimiento de *Chlorella sp.* (Figura 22) en el medio BG11 fue de 0.023 d^{-1} , y en el consorcio de 0.005 d^{-1} ; por el contrario, los resultados obtenidos de la tasa de crecimiento en el medio MEB del consorcio fueron de 0.019 d^{-1} y en *Chlorella sp.* de 0.002 g L^{-1} .

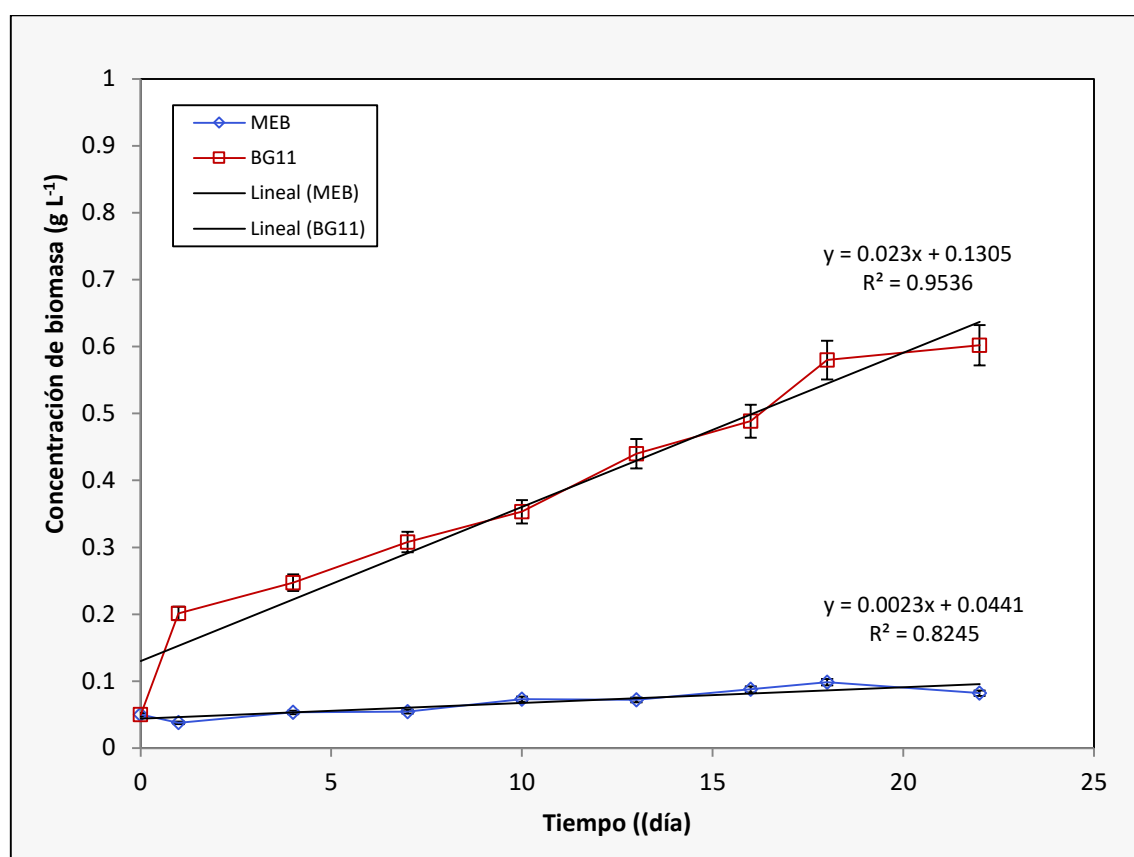


Figura 22 Cinética de crecimiento con MEB y BG11 empleando la microalga *Chlorella sp.*

El consorcio de microalgas presentó un comportamiento similar, debido a que presentó una mejor respuesta con el medio BG11 (Figura 5.8); lo que representa

a un incremento celular de 91% al día 22 y un 67% al día 16 con el MEB y posteriormente registró un decrecimiento correspondiente a 0.012 g L⁻¹.

Es posible relacionar este comportamiento con lo reportado para estos microorganismos, ya que algunas especies de microalgas pueden acelerar su etapa de duplicación o fase exponencial de crecimiento al controlar diversos factores bióticos y abióticos en su cultivo como los nutrientes, la temperatura, el fotoperíodo y el tipo e intensidad de la luz [70].

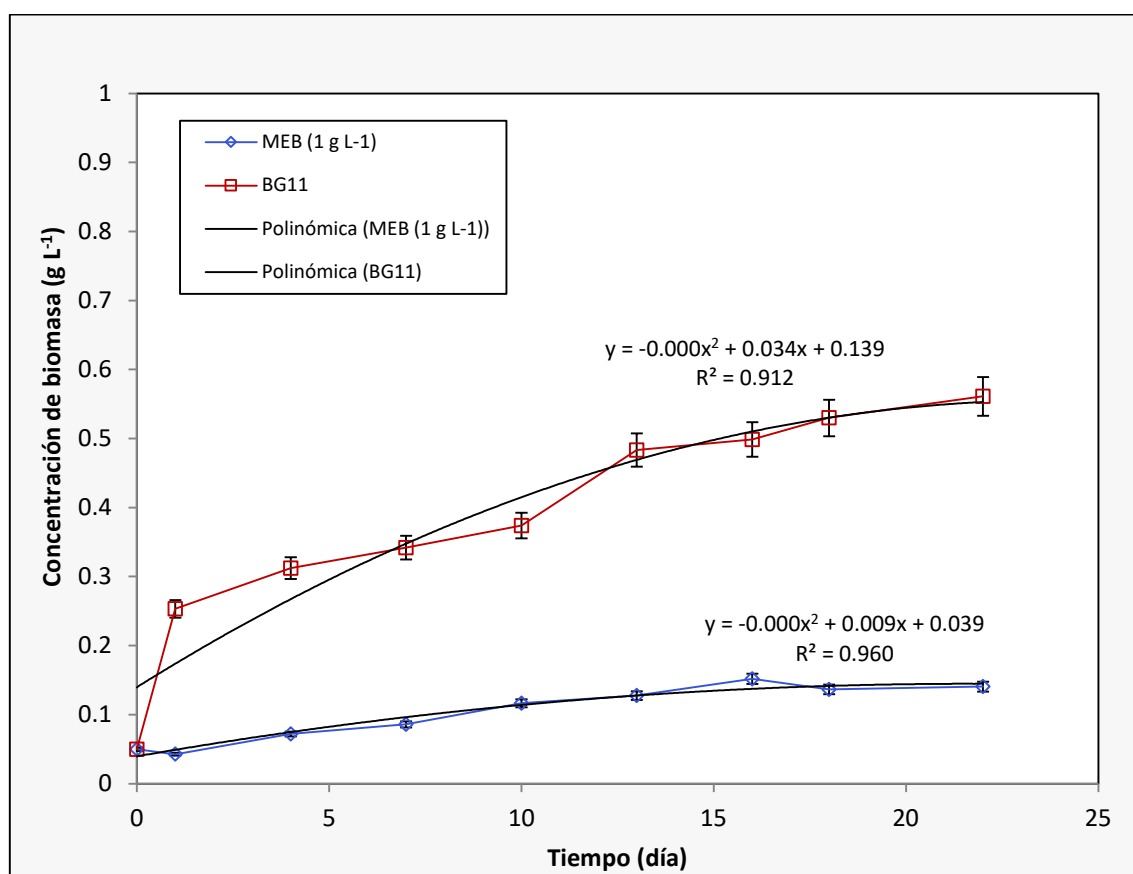


Figura 23 Cinética de crecimiento con MEB y BG11 empleando un consorcio de microalgas

5.5.2 Caracterización de los medios MEB y BG11

Ahora bien, de acuerdo con los resultados obtenidos de la cinética de crecimiento, se realizó la caracterización de los medios utilizados en el punto 5.5-1; y los resultados nos arrojaron que el medio BG11 contiene mayores concentraciones de macronutrientes (nitrógeno y fósforo) comparado con lo contenido en el MEB (Tabla Caracterización de los medios nutritivos (BG11, MEB y MOB)).

Tabla. Caracterización de los medios nutritivos (BG11, MEB y MOB)

	Muestra original de agua	MEB	BG11	MOB	MOB _L	MOB _H
N (g L ⁻¹)	0.0004	-	0.54	7.5	0.1	0.21
P (g L ⁻¹)	0.0007	0.010	0.006	1	0.006	0.015

5.5.3 Cinética de crecimiento mediante un residuo orgánico (MOB)

Debido a que el empleo de N favorece la duplicación celular [87]; se optó por incluir en esta investigación un residuo orgánico (orina) como medio nutritivo para disminuir costos de producción y aprovechar los nutrientes que lo integran. Este residuo se caracterizó y se encontró que contiene niveles mayores de nitrógeno (7.5 g L⁻¹) y fósforo (1 g L⁻¹) que el medio BG11.

Por esta razón, se tomó la referencia de los resultados de la caracterización previa del medio BG11 (N y P), para tomarlo como indicador en cuanto a la concentración de fósforo (0.006 g L⁻¹). Además de que el medio BG11 es utilizado

como nutriente para el cultivo de estos microorganismos [53]. Por lo tanto, el medio de orina (MOB) se empleó en dos concentraciones, 0.006 g L⁻¹(MOB_L) mencionada anteriormente y 0.015 g L⁻¹(MOB_H) para evaluar el comportamiento y la generación de biomasa a partir de una mayor concentración de P en el medio MOB como sustrato (Tabla Cinéticas de crecimiento de *Chlorella sp.* y el consorcio de microalgas en medio nutritivo MOB en diferentes concentraciones bajo luz blanca en ciclos de 12 horas luz oscuridad).

Tabla. Cinéticas de crecimiento de Chlorella sp. y el consorcio de microalgas en medio nutritivo MOB en diferentes concentraciones bajo luz blanca en ciclos de 12 horas luz oscuridad

	<i>Chlorella sp.</i>		Consortio	
	MOB		MOB	
	0.006 g L ⁻¹	0.015 g L ⁻¹	0.006 g L ⁻¹	0.015 g L ⁻¹
Velocidad específica de crecimiento (d ⁻¹)	0.073	0.093	0.015	0.020
Productividad volumétrica (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0.019	0.039	0.019	0.024
Densidad de biomasa (g L ⁻¹)	0.588	0.910	0.454	0.568
R ²	0.766	0.903	0.531	0.603
Desvest	0.741	0.918	0.716	0.754

La biomasa inicial del cultivo de *Chlorella sp.* fue de 0.05 g L⁻¹ (Figura 24), y durante el desarrollo experimental al 1^{er} día, registró un alza de 3.42 y 5.28% en la densidad celular en las dos concentraciones de MOB 0.006 y 0.015 g L⁻¹, manteniéndose hasta el día 16, en donde alcanzo una productividad volumétrica de 0.588 y 0.910 g L⁻¹, decreciendo un 13.2 y 1.7% hasta el último día del cultivo, obteniendo 0.452 y 0.884 g L⁻¹ de biomasa, manteniendo valores de pH de 24±2.

En cuanto al cultivo del consorcio de microalgas en el medio MOB en concentración de 0.006 y 0.015 g L⁻¹ (Figura 5.8), su productividad volumétrica máxima fue de 0.454 y 0.568 g L⁻¹ alcanzada el último día de cultivo (día 22) con las mismas condiciones a las que fue expuesto el cultivo de *Chlorella* sp. A pesar de mantener las mismas condiciones, las variaciones en cuanto a productividad de biomasa en el MOB de 0.015 g L⁻¹ fueron del 48% contrariamente a la concentración de 0.006 g L⁻¹ que mantuvo los mismo valores.

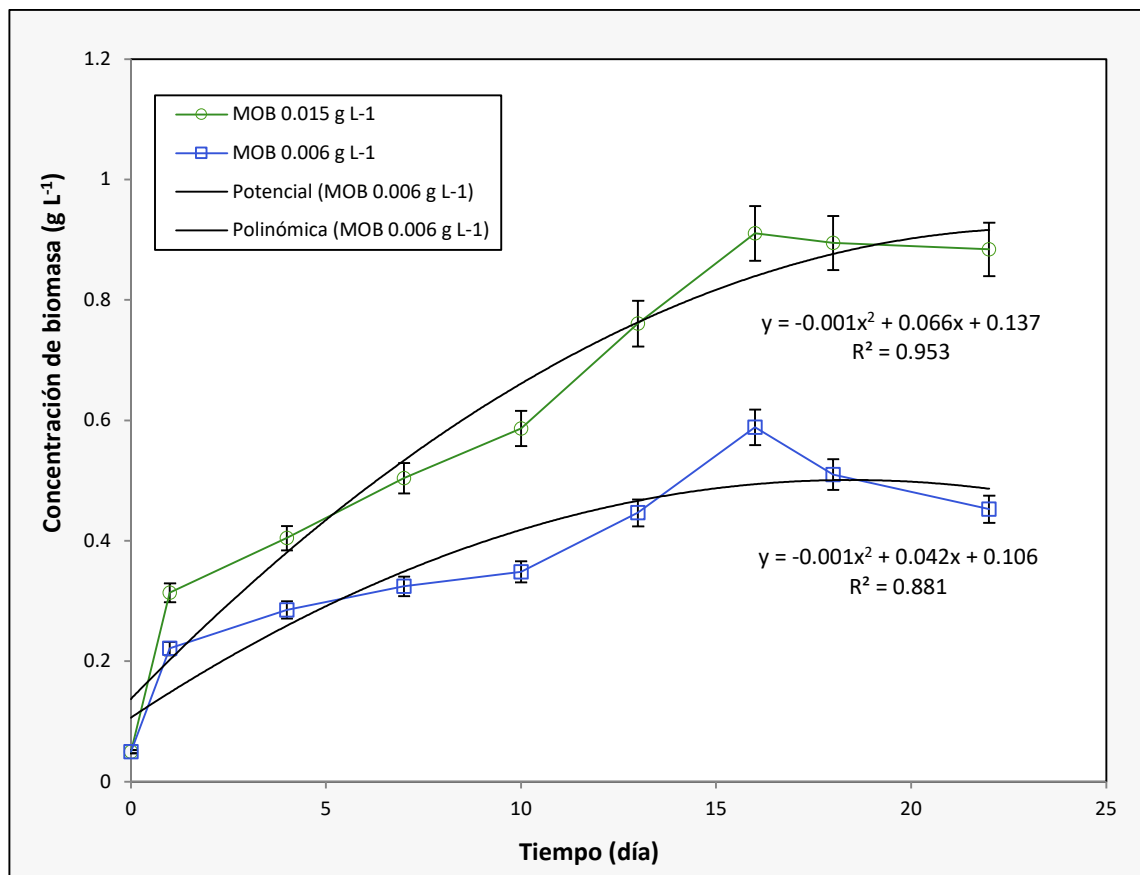


Figura 24 Cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. en medio MOB en dos concentraciones (0.006 y 0.015 g L⁻¹)

Es factible pensar que cada uno de los organismos que conforman el cultivo, aprovechen cualquier suministro de N con la finalidad de optimizar sus procesos metabólicos y fisiológicos [88], en otras palabras, se acelera la duplicación celular. Así mismo, este consumo elevado de un periodo corto de tiempo puede ser atribuible a que células menores a 3 μm . son más rápidas para tomar y asimilar nutrientes que células de mayor tamaño [89]. Se ha reportado que una comunidad planctónica de un río de Colombia, dominada por células bacterianas y fitoplancton principalmente cianofitas, se les atribuye el alto consumo de nitrógeno. [88]

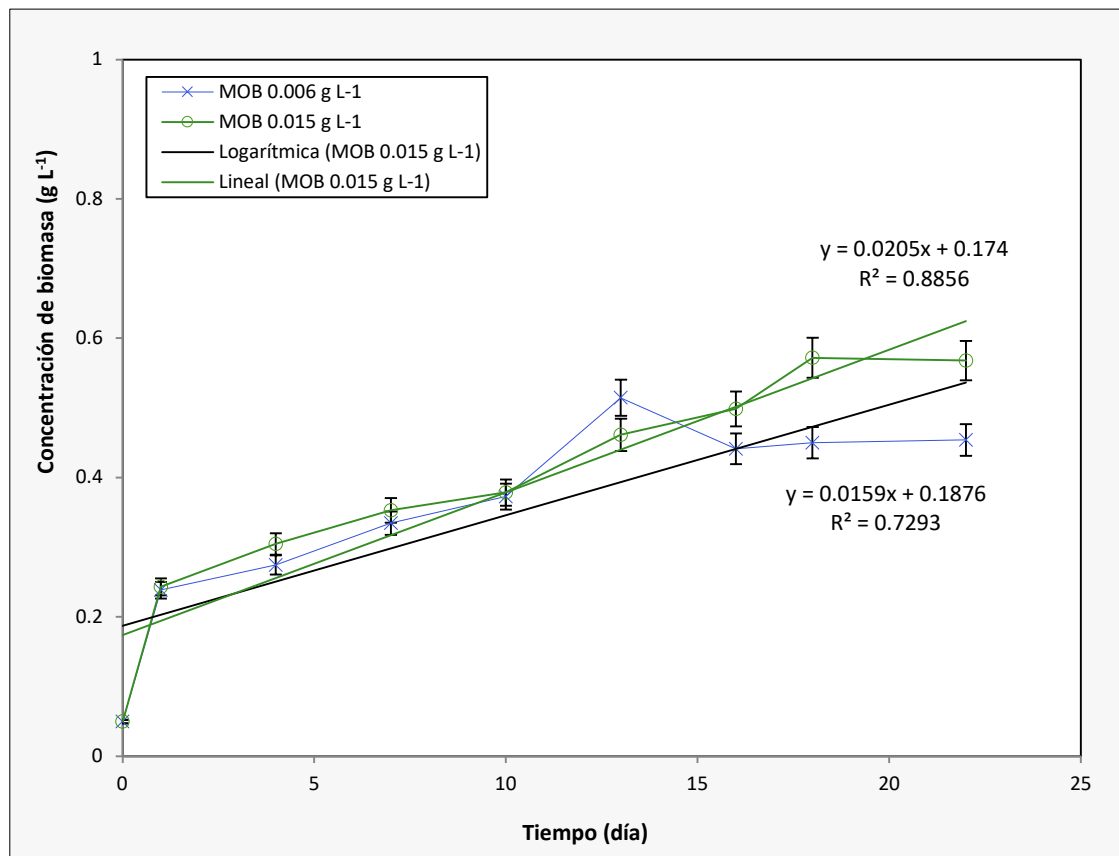


Figura 25 Cinética de crecimiento del consorcio de microalgas en medio MOB en dos concentraciones (0.006 y 0.015 g L⁻¹)

5.5.4 Relación biomasa/sustrato en la cinética de crecimiento de *Chlorella* sp. en MOB en concentración de 0.015 g L^{-1}

Por las consideraciones anteriores, se tomó el MOB en concentración de P de 0.015 g L^{-1} como el medio con el que alcanzamos una mayor productividad volumétrica (0.910 g L^{-1}) y mayor productividad de biomasa microalgal ($0.039 \text{ g L}^{-1}\text{d}^{-1}$). Posteriormente se analizó la relación biomasa/sustrato; en este caso, el sustrato inicial fue de 0.015 g L^{-1} en el medio; el cual se consumió el 27% (0.0108 g L^{-1}) en las primeras 24 horas (Figura 26), para generar 0.315 g L^{-1} de biomasa a partir de la concentración inicial de 0.05 g L^{-1} ; esto representa la variación de la biomasa del cultivo a lo largo del tiempo.

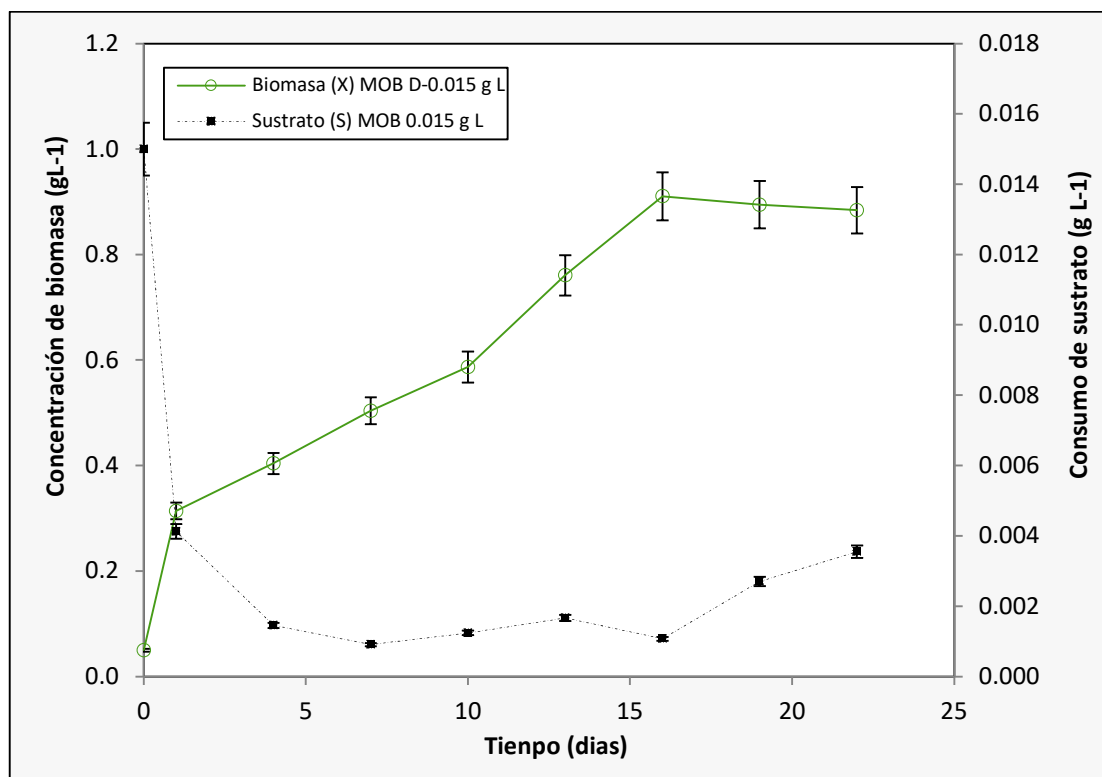


Figura 26 Relación biomasa/sustrato de *Chlorella* sp. en medio MOB en concentración de 0.015 g L^{-1} .

Observamos que, durante el transcurso de la prueba se va agotando el sustrato; el cual se consumió hasta el séptimo día a partir del cual se obtuvo un aumento paulatino en la concentración de P hasta el día 22, el cual registro una concentración de 0.003 g L^{-1} , que corresponde a un consumo total del 23%, con lo que se generó una concentración de biomasa total de 0.884 g L^{-1} .

En este sentido, podemos considerar el rendimiento ($Y_{x/s}$) como la cantidad de sustrato consumido que se requiere para producir una unidad de biomasa; el rendimiento inicial fue de 24, lo que significó una producción de biomasa de 0.264 g L^{-1} al primer día con un consumo de sustrato del 27%.

Este comportamiento fue el esperado debido a que la proporción de N: P planteada por Redfield de 16:1 molar para los organismos fitoplanctónicos, provoca que los iones que son las formas principales en que los productores primarios (en este caso *Chlorella sp.*) asimilan sus demandas nutricionales y que, el P, se encuentra en proporción a la concentración del nitrógeno del medio. En este sentido, podemos afirmar que si un nutriente determinado, es adicionado a un cultivo, la generación de biomasa se incrementa, por lo que, el sistema es considerado como limitado por este nutriente.

En gran parte de los modelos empíricos se ha relacionado la productividad en ecosistemas marinos con una fuerte correlación entre la generación de biomasa y la disponibilidad de nitrógeno. [90]. Comparando los resultados obtenidos en

esta investigación con un estudio realizado en la desembocadura de un río en Colombia, en el que analizaron los cambios netos en la generación de fitoplancton por la adición de nitrógeno y fósforo, se demostró que se incrementan significativamente las tasas de producción primaria neta (fitoplancton) [88]; y es debido a que la adición de nitrógeno incrementa la absorción neta de los iones adicionados.

Respecto al decrecimiento, Sánchez *et al.* (2011) [88] plantea, que después de la adición de un nutriente, puede haber competencia por ATP y agentes reductores entre la toma de nutrientes y la fotosíntesis. Asimismo, se ha demostrado que el metabolismo está dirigido primero hacia la toma de nutrientes y asimilación y luego a la conversión de carbón almacenado en constituyentes necesarios para sostener el incremento en el crecimiento.

5.5.2 Cinéticas de crecimiento a través de la dosificación de CO₂.

Otro de los factores que inciden en el crecimiento de las microalgas es el CO₂, y debido a que casi el 50% de la biomasa de las microalgas se compone de carbono, este elemento es un componente importante para el crecimiento celular, por lo cual, se adiciono CO₂ al cultivo obteniendo los resultados descritos a continuación:

En la figura 27, observamos que la adición de CO₂ al cultivo acidifico el medio nutritivo y los resultados obtenidos registraron variaciones de *Chlorella sp.* y el

consorcio en los medios MEB y BG11; registrando una producción de biomasa máxima de 0.362 y 0.314 g L⁻¹ respectivamente. *Chlorella* sp. cultivada en el medio BG11 (figura 27), mostró dos puntos de crecimiento exponencial al quinto y octavo día, obteniendo un crecimiento máximo de 0.022 y 0.237 g L⁻¹; posteriormente decreció un 38%, obteniendo 0.146 g L⁻¹ como concentración de biomasa final al día 15 de cultivo.

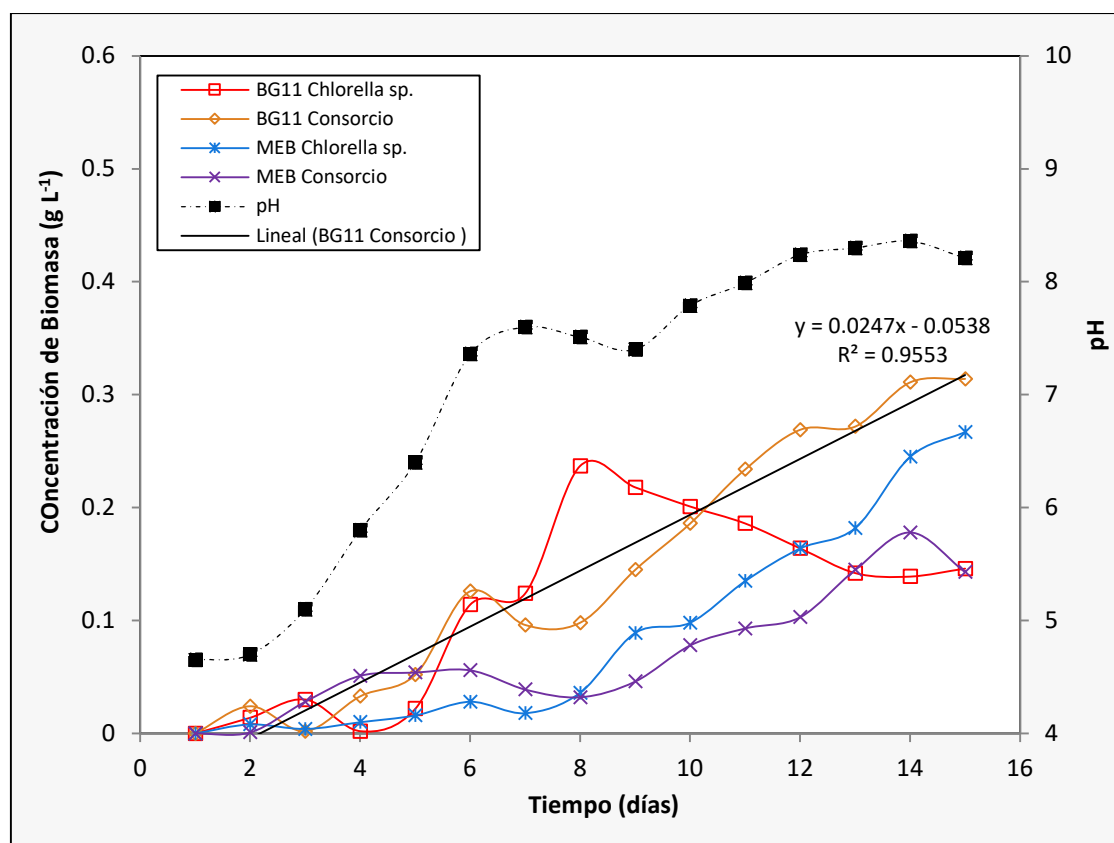


Figura 27 Cinéticas de crecimiento de *Chlorella* sp. y consorcio de microalgas, en MEB y BG11 con adición de CO₂.

En cuanto a la cinética de crecimiento sin la adición de CO₂ (figura 28), del consorcio, encontramos que con el medio BG11, el consorcio tuvo un

comportamiento similar a *Chlorella* sp., alcanzando al 5 día 0.054 g L⁻¹; no obstante, el consorcio presentó un crecimiento paulatino, hasta alcanzar una densidad celular de 0.378 g L⁻¹, lo que representa un incremento del 35% en relación con el cultivo con *Chlorella* sp. Con respecto al cultivo del consorcio + la adición de CO₂ se mostró un decremento del 17%, en comparación con los resultados alcanzados con el cultivo de *Chlorella* sp.

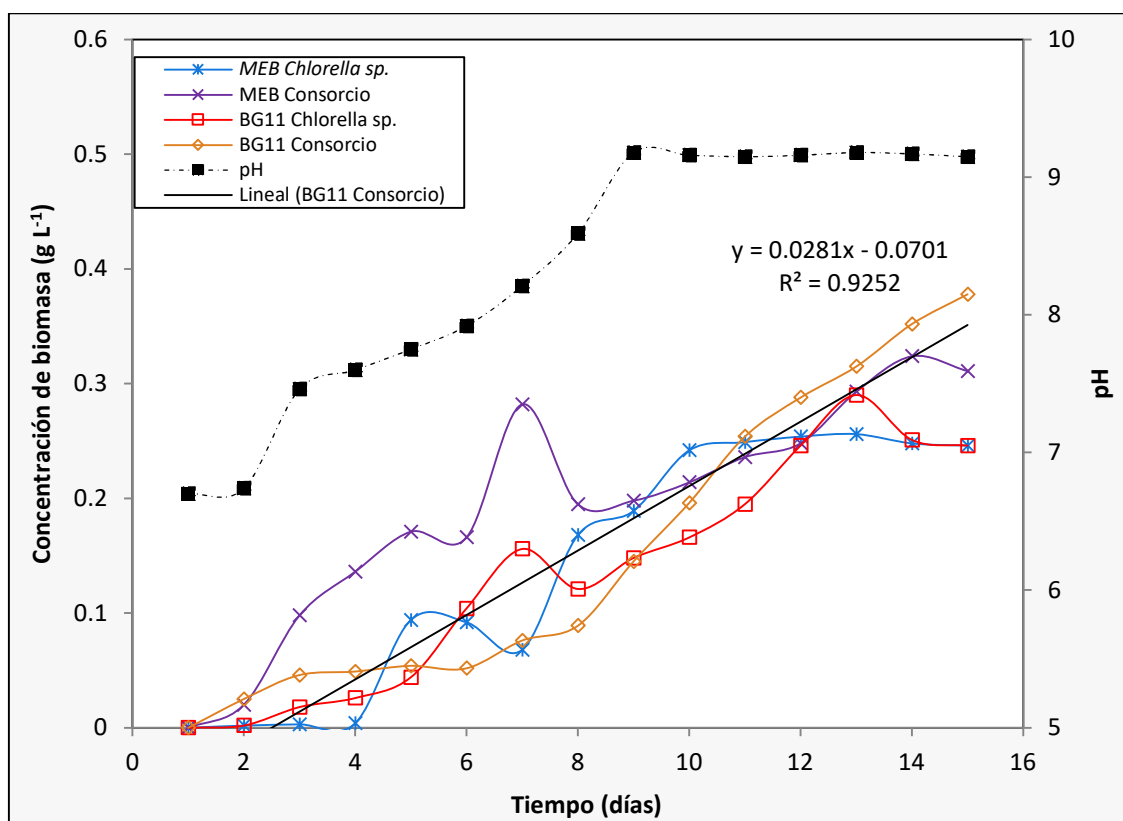


Figura 28 Cinéticas de crecimiento de *Chlorella* sp. y consorcio de microalgas, en medios MEB y BG11 sin la adición de CO₂

Es conveniente mencionar que la generación máxima de biomasa que se registró en el cultivo de *Chlorella* sp. expuesta al medio BG11 + la adición de CO₂; alcanzo

una producción de 0.362 g L^{-1} de biomasa al día 17; así mismo, el cultivo de *Chlorella sp.* en el medio BG11 sin la adición de CO_2 registró una densidad celular de 0.378 g L^{-1} (figura 5.13), lo que representa un incremento de 4.42%. Esta conducta se relaciona directamente al incremento del pH durante el cultivo debido a la actividad metabólica celular.

Este comportamiento se puede atribuir a que estos microorganismos tienen la capacidad de utilizar carbono inorgánico de diferentes formas (CO_2 , H_2CO_3 , HCO_3^- y CO_3^{2-}). Sin embargo, a pesar de que el CO_2 puede ser considerado como fuente de carbono, la acidificación provocada por su adición inhibe sus funciones metabólicas; en otras palabras, al administrar una entrada limitada de carbono inorgánico, es posible mantener los rangos estrechos de pH y así optimizar el proceso de producción de biomasa.

Los resultados obtenidos, también pueden ser atribuidos a que, de acuerdo con algunos estudios, existe una variedad de microalgas (*Scenedesmus sp.* y *Cyanidium caldarium*) que son resistentes a concentraciones desde un 80 a un 100% de CO_2 ; sin embargo, un porcentaje mayor de estos microorganismos tolera únicamente concentraciones menores al 15% de CO_2 en su cultivo [92].

Con relación a lo antes mencionado, una de las microalgas que componen el consorcio es *Scenedesmus sp.*, por lo que se puede explicar que en los resultados obtenidos con el consorcio cultivado bajo el medio BG11 + la adición

de CO₂ se obtuvo un incremento mayor del 100% en con respecto al cultivo de *Chlorella sp.* en BG11 + CO₂.

5.5.3 Cinética de crecimiento mediante la exposición a tres longitudes de onda

Uno de los factores más importantes para el cultivo de las microalgas es la luz, debido a que promueve su crecimiento fotosintético y combinado con el aporte de nutrientes es posible optimizar un cultivo. Es por esto, que se utilizaron los medios de cultivo BG11 y el MOB_H en concentración de 0.015 g L⁻¹ ya que con él se obtuvo el mayor rendimiento.

En cuanto a la exposición del cultivo a la luz, se realizaron pruebas, exponiendo cultivos a tres longitudes de onda, (azul, roja y blanca). Los resultados son descritos en la tabla de Efecto del tiempo de cultivo de *Chlorella sp.* para tres diferentes longitudes de onda y dos medios nutritivos y en la figura 29; en donde se observó que el cultivo expuesto a longitud de onda azul logró una mayor productividad volumétrica de biomasa de 0.091 g L⁻¹ d⁻¹ con el medio MOB con respecto al cultivo expuesto a la longitud de onda blanca; el cual presentó la menor productividad volumétrica, registrando 0.080 g L⁻¹d⁻¹.

Comparando los promedios obtenidos de densidad celular del medio MOB con el medio BG11, observamos que las longitudes de onda roja (0.999 nm en medio MOB) y azul (0.981nm en medio BG11) presentaron el mejor rendimiento (figura 29). Este comportamiento lo podemos atribuir a que la energía y la longitud de

onda están inversamente relacionadas, por lo que un fotón de luz azul (430-500nm) presenta mayor energía, pero la luz roja tiene mayor frecuencia.

Además, *Chlorella sp.* al ser una microalga verde tiene pigmentos fotosintéticos (clorofilas), los cuales presentan un espectro de absorción máximo en las zonas correspondientes al azul y al rojo; por lo que solo absorben en estas dos regiones y reflejan el verde. [93].

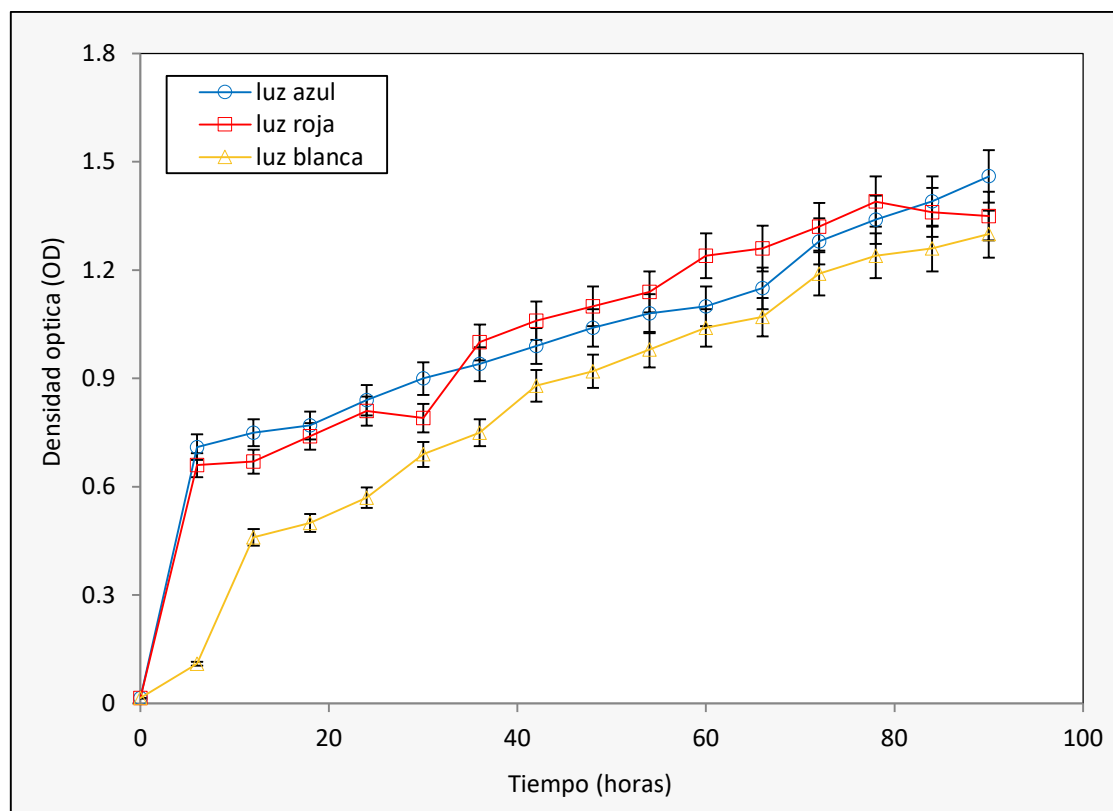


Figura 29 Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* bajo el efecto de diferentes longitudes de onda cultivada en un medio MOB

Por otra parte, al realizar la determinación de crecimiento mediante espectrofotometría, se registraron variaciones. Los cultivos con el medio MOB y

BG11 mostraron el mismo patrón de crecimiento, registrando valores máximos de crecimiento con la exposición del cultivo a la longitud de onda azul (1.46 y 0.98 respectivamente); posteriormente la exposición de los cultivos a la longitud de onda roja, presentaron densidades ópticas de 1.35 y 0.79 nm y finalmente los cultivos expuestos a la longitud de onda blanca 1.3 y 0.60 mn.

En cuanto a la densidad de biomasa generada (tabla Efecto del tiempo de cultivo de *Chlorella sp.* para tres diferentes longitudes de onda y dos medios nutritivo); el cultivo con el medio MOB registró una mayor densidad. Los incrementos fueron los siguientes: con luz azul 8.13%, con luz roja 24% y con luz blanca 45% con respecto a los resultados generados del cultivo con el medio BG11.

Tabla. Efecto del tiempo de cultivo de Chlorella sp. para tres diferentes longitudes de onda y dos medios nutritivos

Longitud de onda (Luz led)	BG11			MOB		
	azul	roja	blanca	azul	roja	blanca
Densidad óptica promedio (nm)	0.981	0.798	0.604	0.990	0.999	0.886
Productividad volumétrica (g L ⁻¹ d ⁻¹)	0.083	0.062	0.064	0.091	0.086	0.080
Densidad de biomasa (g L ⁻¹)	0.935	0.825	0.629	1.011	1.027	0.913
Velocidad específica de crecimiento(h ⁻¹)	0.295	0.271	0.278	0.197	0.193	0.157
R ²	0.743	0.650	0.921	0.834	0.848	0.944

La velocidad específica de crecimiento (μ) para la fase exponencial nos arrojó valores mayores en el medio BG11 que en el medio MOB y esto se debe a que se presentó un mayor crecimiento hasta el día 14, en donde se registró el tiempo de generación máximo e inmediatamente decreció 9.8%. Con longitud de onda azul la velocidad específica de crecimiento fue de 0.197 (h⁻¹) con el medio MOB

y $0.295 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ con el medio BG11; en cuanto a la longitud de onda roja y blanca, con el medio BG11 se obtuvo 0.271 y $0.278 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ y 0.193 y $0.157 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ para el medio MOB.

Encontramos entonces que la relación entre la velocidad de crecimiento y generación de biomasa está influenciada por la exposición a ciertos nutrientes y a las longitudes de onda.

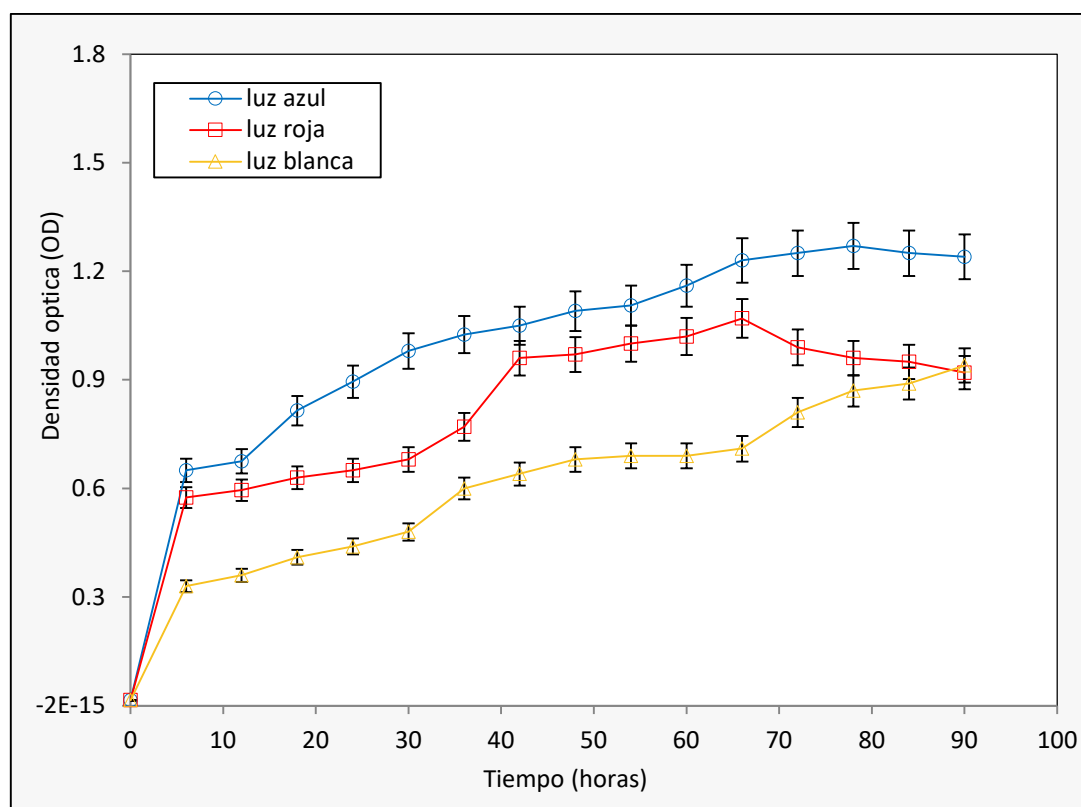


Figura 30 Cinética de crecimiento de *Chlorella sp.* bajo el efecto de diferentes longitudes de onda cultivada en el medio BG11

Benavente-Valdés *et. al.* (2016) [94] menciona que el crecimiento de las microalgas se incrementa conforme a la intensidad de la luz aumenta y cuando

la tasa de crecimiento llega a su punto máximo, ésta disminuye con el incremento de la intensidad debido a la fotoinhibición [94], esto puede explicar el comportamiento del cultivo expuesto a la luz blanca, ya que la longitud de onda blanca engloba todas las longitudes en un rango de 400-700 nm.

Así mismo, este patrón de crecimiento en relación con la intensidad de luz se observa en la mayoría de las especies de microalgas. En base a esto, se ha reportado que la producción y la acumulación de metabolitos de interés comercial, se ve afectada por la radiación de luz blanca en algas, hongos y bacterias [94]. Sin embargo, el régimen de iluminación y la intensidad varía con cada género de microalgas.

Ahora bien, la implementación de la luz led como fuente de energía para el cultivo representa una mejora en el consumo de energía luminosa. El tamaño de la luz LED empleada fue de 5 x 5 mm y tiene un consumo de energía unitaria de 0.045 W; en contraste con 24 W consumidos por una bombilla fluorescente tradicional. La luz LED tiene una eficiencia de 10 a 15 lúmenes con sus variaciones según la longitud de onda utilizada; por ejemplo, Mooij [95] en su investigación, menciona que se obtiene un aumento en la densidad celular mediante el uso de luz amarilla claro, lo que represento un aumento de la biomasa de alrededor del 50% con respecto a los cultivos expuestos a luz azul, rojo-naranja y rojo intenso. En contraste con lo mencionado, otra investigación reveló que el uso de luz azul en los cultivos de microalgas no aumenta la producción de biomasa; sin embargo,

aumenta su concentración de lípidos, lo cual resulta relevante si el propósito es la generación de un biocombustible [79].

En el caso de las células vegetales, específicamente las que tienen clorofila ayb (clorofitas) tienen la capacidad de asimilar en mayor proporción, longitudes de onda azules y rojas [96]; dicho esto, en los resultados encontramos una mayor tasa de crecimiento con longitudes de onda azul y roja, incrementándose un 49 y 40% respectivamente mediante el uso del medio BG11; sin embargo, en cuanto a la biomasa generada, los retornos de productividad volumétrica obtenidos revelan la generación total de biomasa por volumen, en la cual, el cultivo con el medio MOB registró valores de 1.011, 1.027 y 0.93 g L⁻¹, lo que representa un incremento promedio del 25% con respecto al cultivo con el medio BG11 en sus tres longitudes de onda. Esto es posible porque las microalgas tienen moléculas de clorofila que están compuestas por una cola hidrofóbica que se inserta en la membrana del tilacoide y un anillo que contiene porfirina magenta cuya función es absorber la luz para convertirla en energía química y realizar sus funciones metabólicas [97].

5.6 Métodos de recuperación de la biomasa de microalgas

En esta etapa del proyecto se trabajó con dos de los métodos más utilizados para la recuperación de la biomasa debido a su alto porcentaje de recuperación y principalmente a que no es necesario agregar ningún agente químico durante su proceso para no alterar la composición de la muestra.

El método más eficiente para este proceso fue la centrifugación, con un tiempo de recuperación de biomasa de 20 minutos y una eficiencia del 84.7%; en contraste con el método de sedimentación, con el cual el tiempo de recuperación total fue de 24 horas con una eficiencia del 40.52%; recuperando 5.93 g L⁻¹ y 1.53 g L⁻¹ respectivamente.

5.7 Caracterización de la biomasa microalgal

5.7.1 Caracterización y determinación de componentes celulares

Se presentó una importante variación en la composición bromatológica de la biomasa entre los cultivos de acuerdo con los medios nutritivos que se utilizaron; en este caso, el uso del medio MOB logró un incremento en su composición en cuatro de sus cinco componentes (Tabla Perfil bromatológico de *Chlorella sp.* en dos medios de cultivo); en cuanto al contenido en la concentración de carbohidratos el aumento fue del 88% con respecto al BG11.

Tabla. Perfil bromatológico de Chlorella sp. en dos medios de cultivo

Composición %	BG11	MOB
Total de carbohidratos	3.81	31.44
Total de cenizas	1.36	4.51
Contenido de lípidos	0.2	11.07
Humedad	90.53	9.75
Proteínas	4.1	43.23

Los lípidos, proteínas y cenizas se incrementaron en la biomasa generada mediante el uso del medio MOB en relación con el medio BG11 un 88, 98 y 70%

respectivamente; por el contrario, la biomasa generada con el medio BG11, reporto únicamente un mayor contenido de humedad (90.5%) (Figura 32).

Con respecto a la caracterización, muchas investigaciones se centran en la generación de biocombustibles a partir de algas; por lo que su enfoque general es el análisis de ácidos grasos y dejan de lado su composición bioquímica [50,91,98]. En esta investigación se destaca la concentración proteica alcanzada, incrementándose un 90.5% utilizando el medio MOB, lo mismo se registró para el contenido de lípidos y carbohidratos, un 54.3 y 7.25% respectivamente.

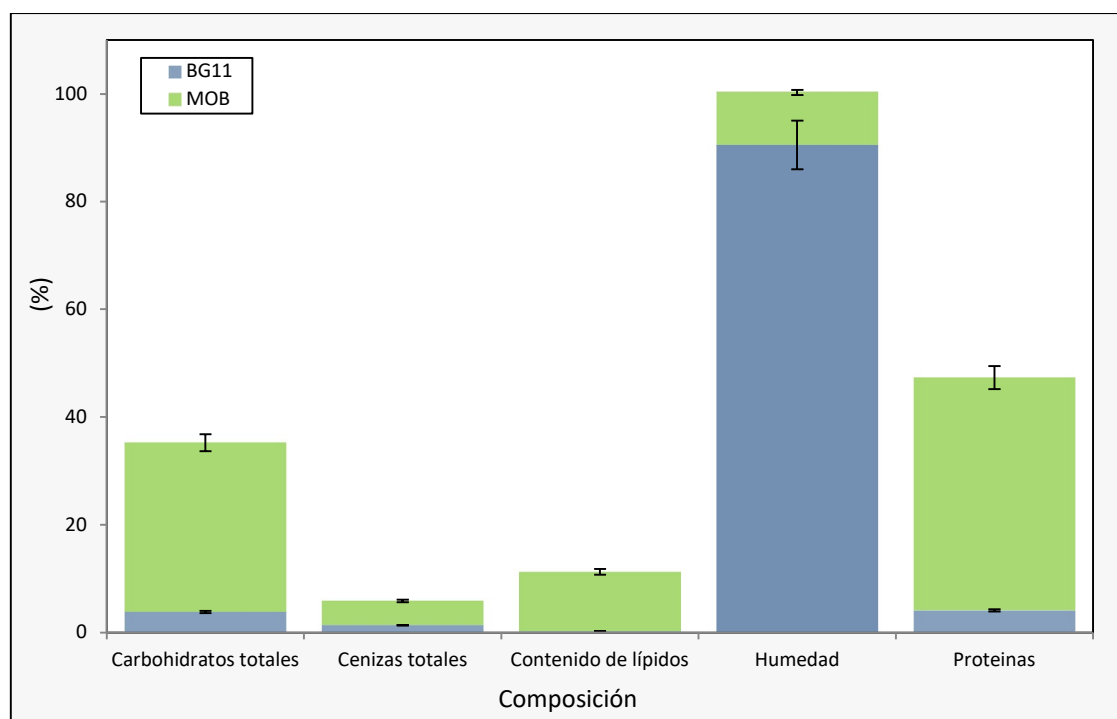


Figura 31 Perfil bromatológico de la biomasa de Chlorella sp. con los medios BG11 y MOB en concentración de 0.015 g L⁻¹ en cultivo de luz blanca con ciclos de 12 horas L:O

De acuerdo con un estudio desarrollado con *Chlorella vulgaris* [99, 100] en el cual se analizó su composición bioquímica, se encontró que las concentraciones obtenidas de grasas e hidratos de carbono son menores que las alcanzadas en esta investigación; en relación con la concentración de carbohidratos. Morris *et al.* (1996) [99] y Andrade *et al.* (2007) [100], reportan 17 y 10%; en ácidos grasos 5.25 y 0.29% y en proteínas 56 y 44%; en contraste, en esta investigación se logró con el medio MOB registrando 31.44% de carbohidratos, 43.23% de proteínas y 11.07% de ácidos grasos. Por lo que posee el potencial para ser explotado como complemento en alimentación de otros organismos.

En el mismo orden de ideas, Coppens *et al.* (2016) [101], realizó un estudio en el cual aumentó la concentración de proteínas en un cultivo de *Arthrospira platensis* utilizando orina y medio nutritivo Zarrouk; primero se trabajó con *Nitrobacter sp.* para nitrificar el medio y enseguida el medio ya nitrificado se utilizó para el cultivo de la microalga *A. platensis*. Y resultó una alta tasa de crecimiento y biomasa con alto contenido de proteína (62%). Feng *et al.* (2006) [102], trabajó con *Spirulina platensis* para producir biomasa utilizando tres medios nutritivos: medio Zarrouk, un medio sintético de orina humana y orina humana; el cual reportó altas concentraciones de biomasa, 3.7, 2.40 y 2.32 g L⁻¹ respectivamente.

Además, se realizó la caracterización de la biomasa generada y obtuvieron concentraciones de proteína y lípidos en el medio Zarrouk de 67 y 11% respectivamente; en el medio sintético de orina humana de 35 y 17% respectivamente; y finalmente con el medio de orina humana se logró un

incremento de un 32 y 20%. Sin embargo, no fue posible realizar una comparación con los resultados obtenidos en este estudio, debido a que no se reportó la caracterización del medio de orina humana.

Finalmente, de acuerdo con los resultados publicados, se encontraron variaciones en la composición general de las microalgas según las especies utilizadas y el medio nutricional. Becker (2007) [103] mencionó que *Chlorella vulgaris* tiene una concentración entre 51-58% de proteína, 12-17% de carbohidratos y 12-22% de lípidos; *Chlorella pyrenoidosa* 57% de proteína, 26% de carbohidratos y 2% de lípidos; mientras que *Spirogyra sp.* 6-20% de proteína, 33-64% de carbohidratos y 11-21% de lípidos. Es importante mencionar que las microalgas incorporan nitrógeno no proteico (NH_4 , NO_3 , NO_2 y urea) para ser posteriormente convertidas en proteínas, razón por la cual, se atribuye que, en los resultados obtenidos en este estudio, el cultivo de *Chlorella sp.* con la mayor concentración de nitrógeno (MOB_H) registró los valores de proteína más altos.

Estos resultados fueron consistentes con los de Mutlu *et al.* (2011) [104], que cultivó a *Chlorella vulgaris* bajo diferentes concentraciones de nitrógeno; y obtuvo que la concentración de proteínas en condiciones suficientes de nitrógeno fue mayor (50,8%), mientras que el cultivo sin presencia de nitrógeno registró una concentración de proteínas de 13,01%. Por tanto, de acuerdo con estos resultados, se asume que la concentración de proteína es función de la concentración inicial de nitrógeno en la que crecen las microalgas.

5.7 Métodos de extracción de ácidos grasos

Durante este proceso se utilizaron diferentes solventes (hexano y cloroformo) mediante el uso de dos métodos.

Con el método de Soxleth, el uso de hexano y/o cloroformo provocó una mayor lisis celular; lo que permitió obtener un mayor porcentaje de recuperación de lípidos. En este proyecto se obtuvieron porcentajes de recuperación del 0.76 con hexano y 3.48% con cloroformo en lapsos de tiempo de 14 y 10 horas respectivamente.

En cuanto al método Clevenger, se utilizó el cloroformo como único solvente y los tiempos de recuperación se redujeron drásticamente, lo que nos permitió la recuperación inmediata del aceite, ya que al terminar la destilación se recobró el aceite sin necesidad de procesarlo y se obtuvo aproximadamente el 10% (2.5 mL) en un lapso de 4 horas.

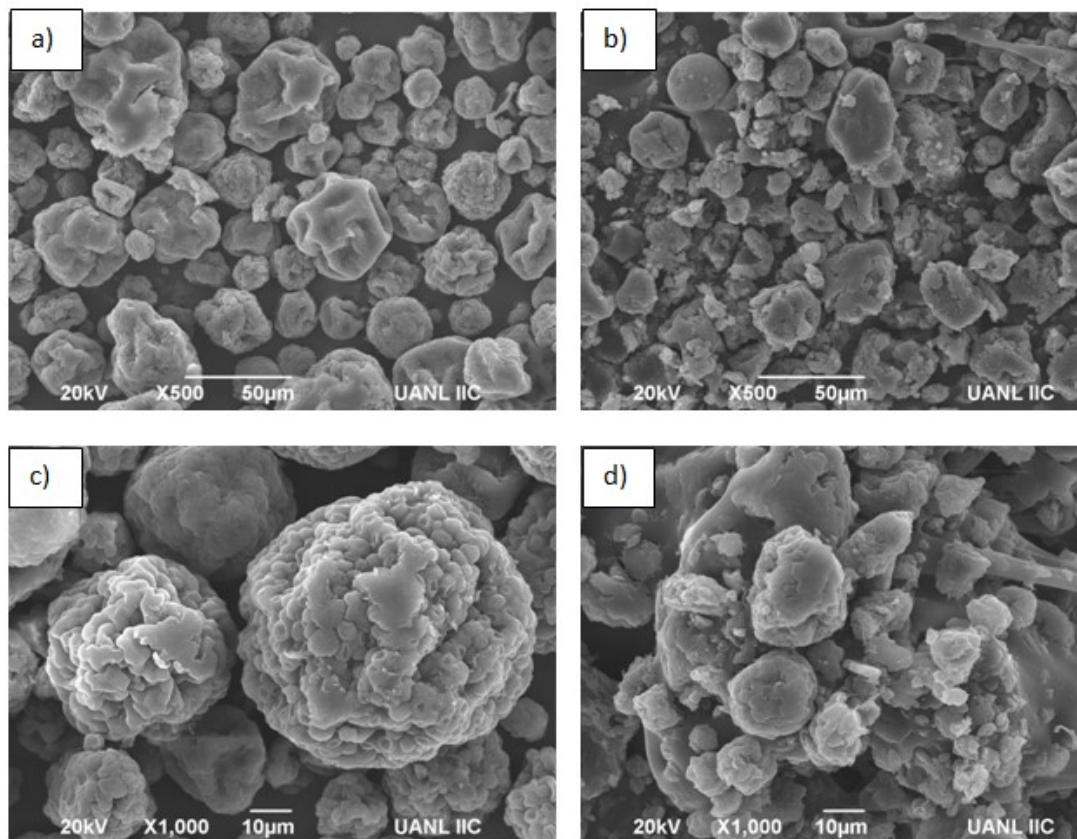
Cabe destacar que al igual que las plantas, las microalgas tienen paredes celulares que se vuelven industrialmente relevantes durante la cosecha y el pretratamiento [91]. Las paredes de células microcristalinas son típicamente más gruesas que las de otras células vegetales y contienen una variedad de polisacáridos; entre ellos celulosa, aportando rigidez a la célula. Dificultando la extracción de ácidos grasos (lípidos) para la producción de biocombustibles.

Es por esto, que el uso del cloroformo, que es un disolvente orgánico miscible a gran cantidad de compuestos orgánicos, sigue siendo muy utilizado en los procesos de extracción [98].

5.7.1 Confirmación de lisis celular mediante la técnica de microscopia electrónica de barrido (SEM)

De las muestras tratadas con los diferentes solventes para la extracción de ácidos grasos de la microalga *Chlorella* sp., se seleccionó una para confirmar el daño causado a su célula; por lo que las imágenes de SEM nos ayudaron a visualizar la morfología de *Chlorella* sp. en su forma natural en ausencia de algún procedimiento permitiéndonos identificar la lisis celular a la que fueron expuestas mediante el uso de cloroformo como solvente.

Estos solventes provocaron la ruptura celular de las microalgas [105], permitiendo la liberación de los aceites contenidos en su estructura para su recuperación y análisis. Apreciamos en la figura 33, la fractura de la pared celular de *Chlorella* sp. después del tratamiento, por lo que se confirma la mayor recuperación de aceite utilizando este solvente.



*Figura 30 Micrografía electrónica de barrido en dos resoluciones (SEM)
a,c) Imágenes de Chlorella sp. natural sin ningún tratamiento,
b,d) Imágenes de Chlorella sp. después del método Soxhlet
empleando cloroformo y metanol como solventes*

5.7.2 Perfil de ácidos grasos

Con respecto al perfil de ácidos grasos, se determinaron cantidades promedio de los lípidos totales obtenidos en *Chlorella* sp. y un consorcio microalgal, en donde los resultados fueron diversos (Tabla Determinación de la concentración de ácidos grasos de *Chlorella* sp. en dos medios de cultivo). Las SFAs en las dos muestras con el medio MOB registraron valores de 17.22 y 15.58% en *Chlorella* sp. y el consorcio de microalgas respectivamente, presentando una diferencia en

la concentración de 7.93 y 0.11 respectivamente, correspondiente a un incremento del 36.92 y 0.70%.

Las concentraciones mayores corresponden a los MUFAs (Figura 34). Las muestras con los dos diferentes medios nutritivos presentan una similitud entre *Chlorella* sp. y el consorcio microalgal en los dos medios nutritivos (MOB y BG11) con una variación de 0.70% únicamente.

Tabla. Determinación de la concentración de ácidos grasos de Chlorella sp. en dos medios de cultivo

Ácidos grasos %	Chlorella sp.		Consortio	
	BG11	MOB	BG11	MOB
SFAs	25.15	17.22	15.69	15.58
MUFAs	47.35	60.75	60.05	62.16
PUFAs	27.5	22.03	24.26	22.26

Es notable que el contenido total de ácidos grasos polisaturados en *Chlorella* sp. y el consorcio de microalgas decrecieron 19.89 y 8.01% empleando el medio MOB; por otro lado, *Chlorella* sp. con el medio BG11, alcanza la concentración mayor de 27.5% de PUFAs.

Por tal motivo las microalgas pueden considerarse una fuente de PUFAs cuando se cultivan en ambos medios. Darki *et al.* (2017) [106], menciona que los PUFAs son de los ácidos grasos más importantes y son la clave en la nutrición animal. La fuente convencional de PUFAs es el aceite de pescado; sin embargo, su uso

presenta limitaciones importantes, como olor indeseable, baja estabilidad oxidativa y presencia de contaminantes [42, 107].

En cuanto a los MUFAs, se utilizan por sus beneficios para la salud; principalmente el ácido oleico, que se usa ampliamente como aceite de cocina debido a sus beneficios de monoinsaturación para reducir las lipoproteínas de baja densidad, ayuda a reducir la presión arterial y las enfermedades cardíacas [108]. Los SUFAs pueden jugar un doble papel, como depósito de ácidos grasos saturados para utilizarlos como fuente de energía y como depósito de PUFAs necesarios para integrarse en diversos procesos metabólicos y síntesis de fosfolípidos y diversas estructuras de membrana.

Con base a lo antes mencionado, es posible sugerir que el rendimiento total de lípidos de microalgas no solo depende de la concentración de biomasa, sino también del contenido de aceite de la célula, es claro, que, en condiciones de estrés debido a la limitación de nutrientes, el crecimiento celular disminuye y, por el contrario, el contenido de lípidos aumenta [87].

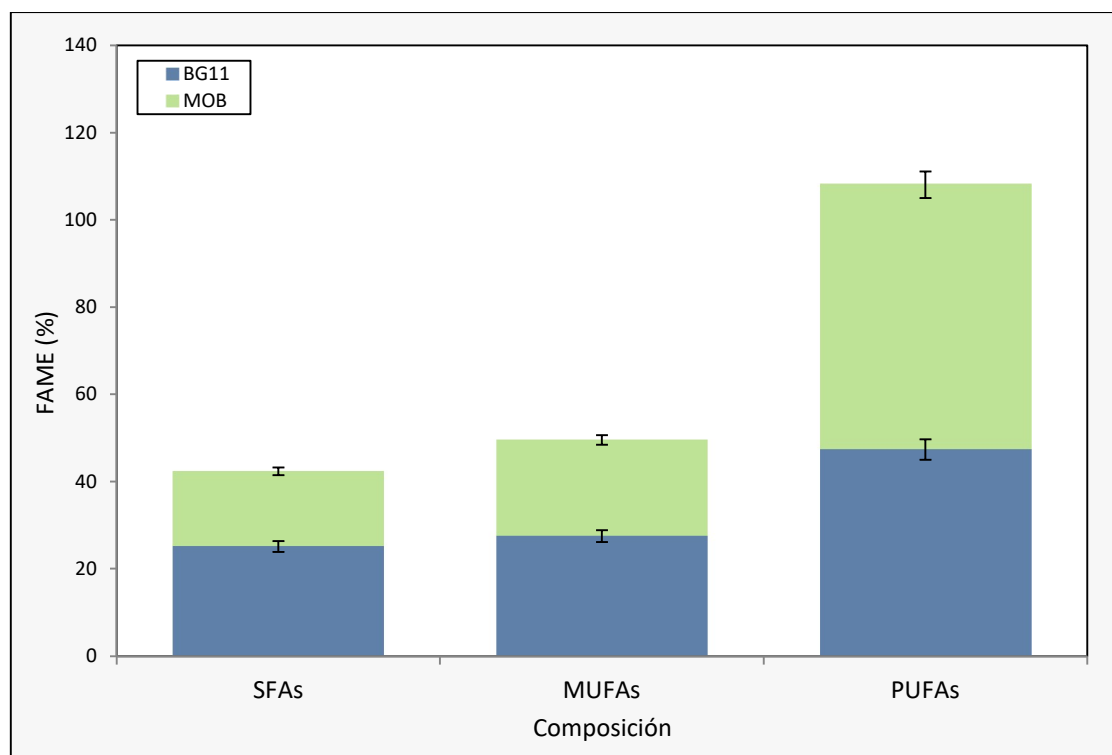


Figura 31 Perfil de ácidos grasos en la biomasa de *Chlorella sp.* con los medios BG11 y MOB en concentración de 0.015 g L^{-1} en cultivo de luz blanca con ciclos de 12 horas L:O

Los resultados obtenidos se correlacionan las concentraciones de ácidos grasos, con la variación del medio nutritivo debido a que las condiciones de cultivo permanecieron sin cambio en todas las muestras. Esto contrasta con lo anterior, se encontró que el aumento de las concentraciones de nitrógeno y fósforo MOB (Tabla Perfil bromatológico de *Chlorella sp.* en dos medios de cultivo), incrementó la concentración de ácidos grasos de 53 y 98% del consorcio y *Chlorella sp.* respectivamente; en cambio, las concentraciones de carbohidratos y proteínas disminuyeron en el consorcio de microalgas en aproximadamente 90%.

Posteriormente, se determinó el perfil de ácidos grasos por medio de cromatografía (Figuras 35 y 36), en donde se comprobaron diferencias entre *Chlorella* sp. y el consorcio de microalgas en el medio nutritivo MOB empleado.

En cuanto a *Chlorella* sp. cultivada en medio MOB (Figura 35) su cromatograma nos revelo la presencia de cinco ácidos grasos, el palmítico (C:16:0), esteárico (C:18:0), oleico (C:18:1), linoleico (C:18:2) y el linolenico (C:18:3); apareciendo a los minutos 4.97, 7.05, 7.28, 7.82 y 8.53 respectivamente.

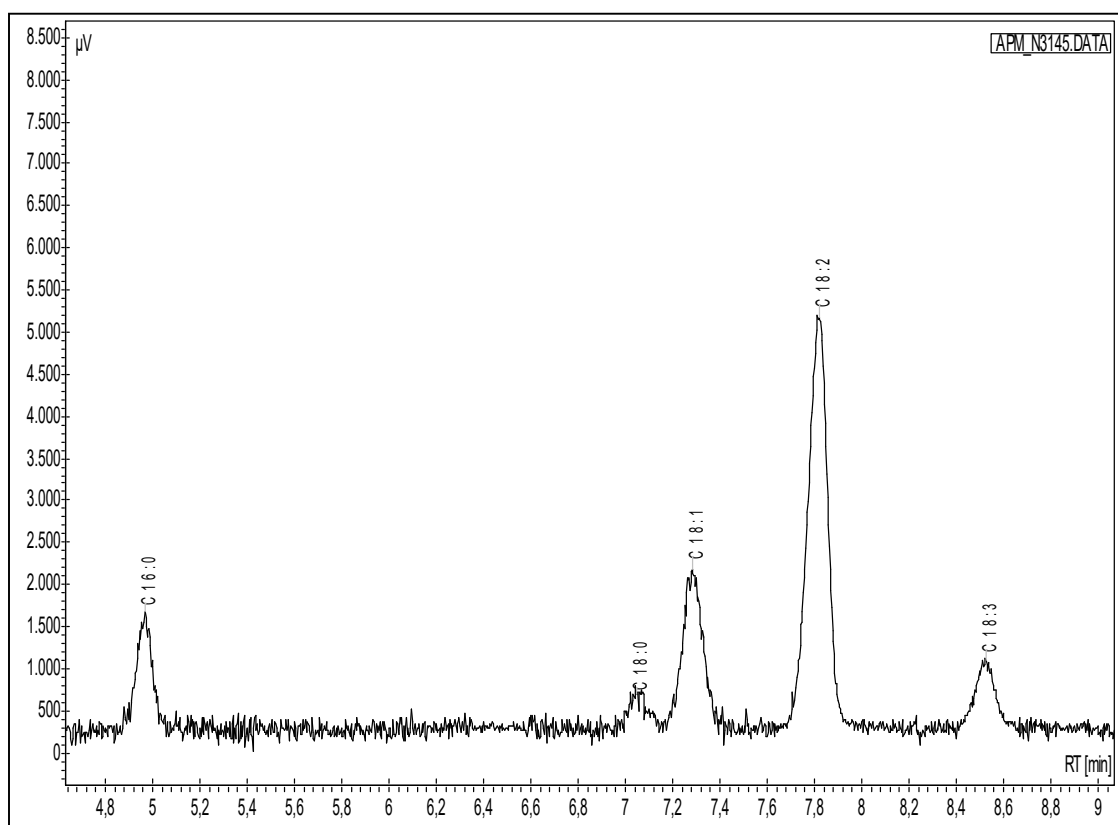


Figura 32 Cromatograma (análisis FAMES) ampliado durante los primeros 9 minutos del extracto lipídico de Chlorella sp. cultivada en medio MOB bajo luz blanca en ciclos de 12 horas L:O

Por otro lado, el consorcio cultivado en medio MOB (Figura 36), reporto los mismo cinco ácidos grasos: C:16:0, C:18:0, C:18:1, C:18:2 y C:18:3 con variaciones en el orden de aparición en los ácidos grasos palmítico, linoleico y linoleico.

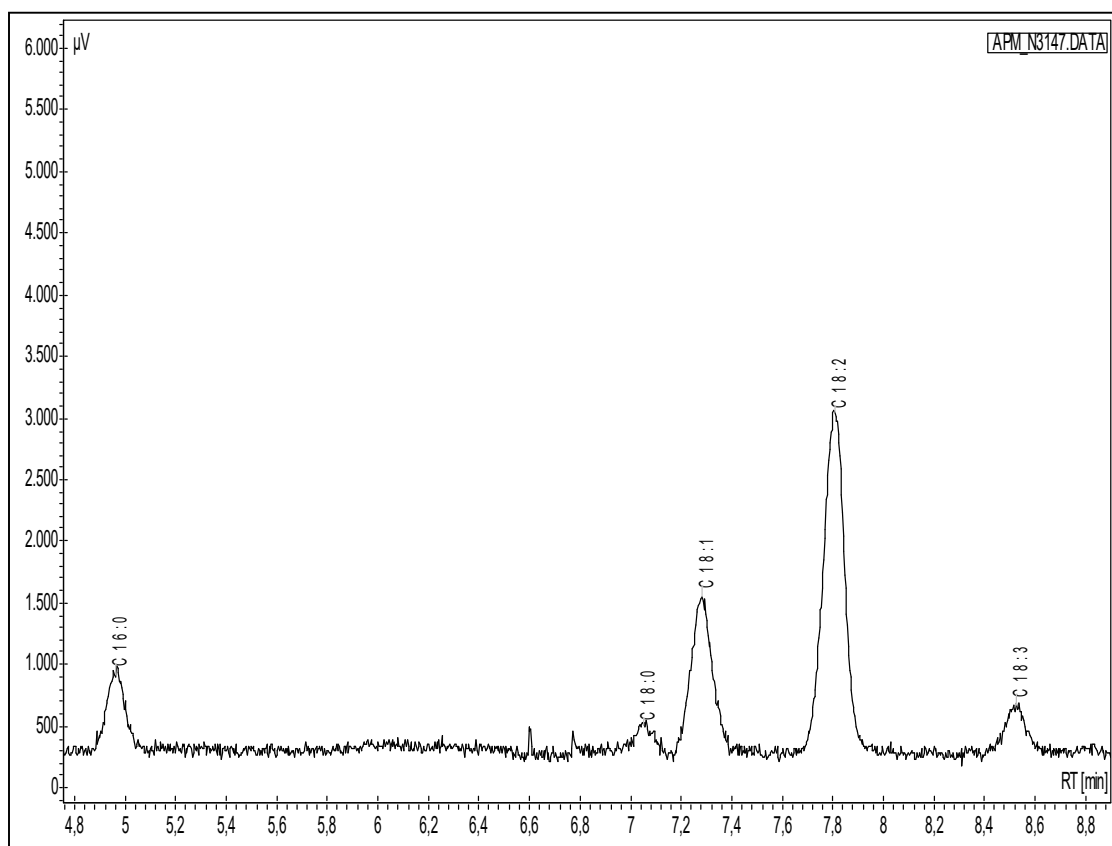


Figura 33 Cromatograma (análisis FAMES) ampliado durante los primeros 8.8 minutos del extracto lipídico de un consorcio de microalgas cultivadas en medio MOB bajo luz blanca en ciclos de 12 horas L:O

En relación con lo antes mencionado, resulta oportuno mencionar que únicamente en *Chlorella* sp. cultivada en el medio BG11 se detectaron los ácidos grasos C:16:1 y el C:20:5 con valores de 10.06 y 2.31% (Tabla Determinación de la concentración de ácidos grasos de *Chlorella* sp. en dos medios de cultivo.); asimismo las concentraciones de los ácidos C:16:0 y C:18:3 se incrementaron

42.6 y 63% respectivamente con relación a la biomasa cosechada del cultivo con MOB.

Tabla. Determinación de la concentración de ácidos grasos de Chlorella sp. en dos medios de cultivo

	<i>Chlorella sp.</i>		Consortio	
Composición %	BG11	MOB	BG11	MOB
(C:16:0)	20.19	11.59	11.38	10.62
(C:18:0)	4.96	4.96	4.20	5.07
(C:16:1)	10.06	---	---	---
(C:18:1)	17.44	22.03	22.26	24.26
(C:18:2)	21.80	52.18	54.62	52.21
(C:18:3)	23.24	8.57	7.54	7.84
(C:20:5)	2.31	---	---	---

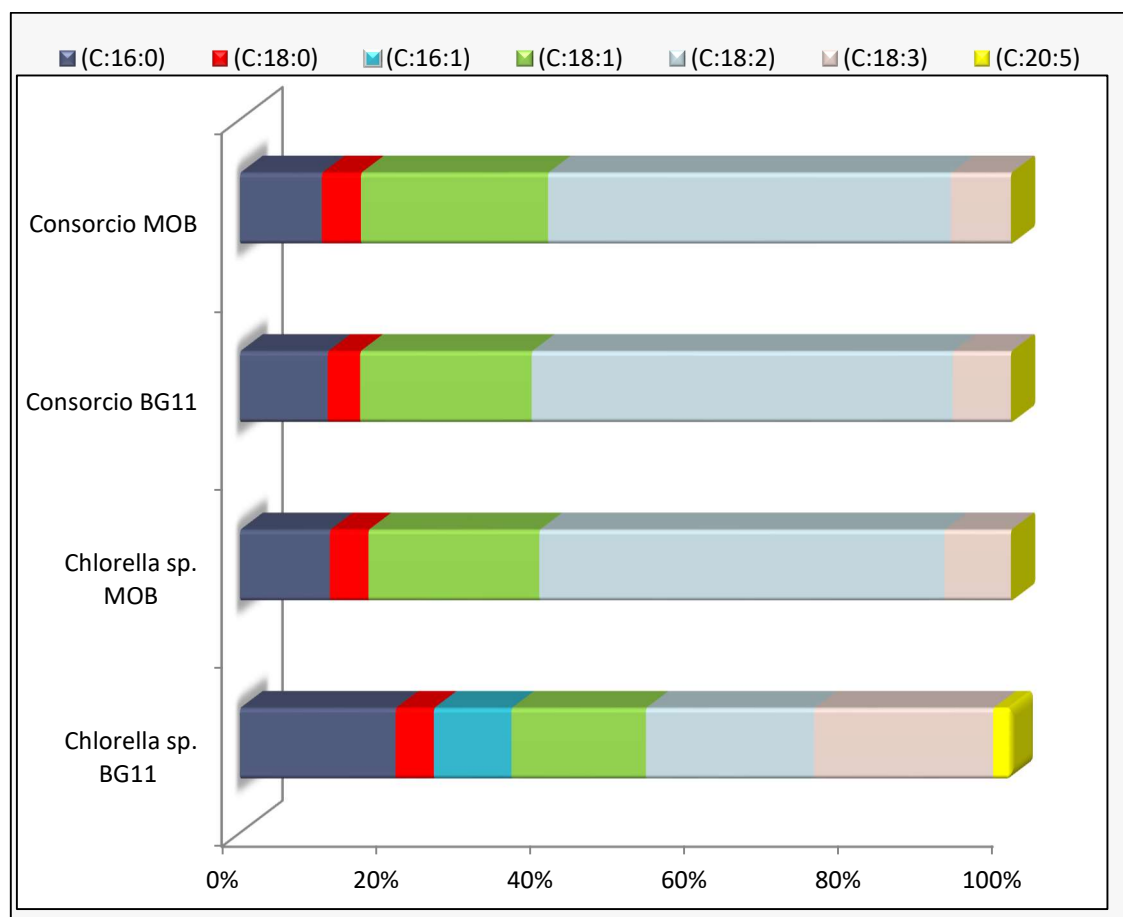


Figura 34 Perfil de ácidos grasos en Chlorella sp. y un consorcio de microalgas cultivadas en dos medios nutritivos

En este mismo sentido, en el consorcio de microalgas, el ácido graso C:18:1 incrementó su concentración 8.98% con el uso del medio MOB y decreció 4.62%.

Es importante resaltar que los principales ácidos grasos presentes en los aceites vegetales tienen 16 y 18 átomos de carbono, siendo los más comunes el C:16:0, C:18:0, C:18:1, C:18:2 y C:18:3 [42]. En este proyecto encontramos variaciones tanto en la composición como en la presencia de los ácidos grasos, fluctuando de acuerdo al medio nutritivo al que fueron expuestos; en general, encontramos porcentajes de SFAs mayores en *Chlorella* sp., 25.15 y 17.22% en el BG11 que en el MOB; compuestos por C:16:0 y C:18:0; en cuanto a los MUFAs *Chlorella* sp. cultivada en BG11 contiene C:16:1 y C:18:1 y el MOB únicamente se encontró C:18:1 y por último los PUFAs son C:18:2, C:18:3 en los dos medios nutritivos y y C:20:5 únicamente en BG11 (Figura 37).

En general, la biomasa del consorcio de microalgas mostró una concentración similar de ácidos grasos en los cultivos con BG11 y MOB_H (Tabla Determinación de la concentración de ácidos grasos de *Chlorella* sp. en dos medios de cultivo); específicamente, una mayor concentración de PUFA, con valores altos de C:18:2 (ácido linoleico), MUFAs con C:18:1 (ácido oleico) y bajas concentraciones de SUFAs. La biomasa de *Chlorella* sp. el cultivo con medio BG11 fue la única muestra de biomasa que registró la presencia de C:16:1 (ácido palmitoleico); y aumentar los valores de C:16:0 (ácido palmítico) y C:18:3 (ácido linolénico). Por otro lado, la biomasa de *Chlorella* sp. cultivada en el medio MOB_H aumentó la concentración de ácido oleico en un 26% y ácido linoleico en un 139%,

disminuyendo la misma proporción de ácido linolénico con respecto a la biomasa producida en el cultivo del medio BG11.

El ácido linolénico (C:18:3) y el ácido linoleico (C:18:2) están en el grupo de los PUFAs debido a su alto número de saturaciones. Comúnmente se denominan Omega 6 y 3. Estos ácidos juegan un papel importante en la función cerebral y muchos otros beneficios para la salud. Este estudio mostró que el consorcio de microalgas y *Chlorella sp.* son una opción para la producción de ácidos grasos esenciales debido a que ambos cultivos presentan altas concentraciones de PUFAs que presentan un promedio de 60% en su composición.

En la actualidad se están realizando ensayos para incrementar la concentración de ácidos grasos en microalgas mediante ingeniería genética. Sin embargo, en los resultados de sus pruebas, mostraron una concentración de PUFAs después del cultivo de *Chlorella sp.* en medio BG11 al 41.32% y tras el tratamiento mediante el uso de una enzima lograron aumentar su concentración al 54.2% [109]. En nuestra investigación se obtuvieron valores de PUFAs de 47.35% cultivando *Chlorella sp.* En medio BG11 y de 60.75% cultivándola en MOB_H. Eso representa una mayor concentración sin exponer las microalgas a la ingeniería genética, reduciendo costos y evitando la exposición a alteraciones genéticas.

5.8 Transesterificación

Posterior a los tratamientos de extracción de ácidos grasos con solvente, estos, son convertidos en biodiesel, ya sea por transesterificación, uso directo y mezcla, micro-emulsiones o pirólisis. La técnica más común es la transesterificación porque su producto puede usarse directamente en motores puros o en mezclas sin modificaciones adicionales [59]. La transesterificación reduce la viscosidad de TAG. El proceso generalmente requiere catalizadores de metanol, ácido o álcali para que se produzca la reacción, produciendo glicerol, exceso de ácido/álcali/metanol y la presencia de lípidos que no se transformaron durante la transesterificación como productos finales [110]. Las reacciones de transesterificación se muestran en la Fig.6. Siendo este el método más popular actualmente utilizado en la industria.

Las condiciones de reacción tienen baja temperatura, presión, y el tiempo de reacción es rápido, pero los ácidos grasos libres (FFA) en la fracción lipídica reaccionan con la base formando jabón en una reacción de saponificación que causa gelificación en la mezcla de reacción y reduce la conversión global.

Para eludir la saponificación, los químicos han propuesto la transesterificación catalizada usando ácidos como el ácido sulfúrico o clorhídrico [110]. Sin embargo, esta técnica generalmente se evita porque el ácido es corrosivo para el equipo y requiere un alto volumen de metanol y altas temperaturas y es aproximadamente 4000 veces más lento que la catálisis alcalina [110, 111, 112].

En la figura 38, se muestra el proceso de producción de biodiesel mediante transesterificación química. El rendimiento del biodiesel alcanzo un máximo del 30% de los lípidos totales con NaOH como catalizador para producir FAMES bajo parámetros de operación de 70°C, con un tiempo de reacción de 2 horas, separación de 14 h, 2 lavados de purificación y una relación seca de microalgas de 1/3 que tienen una mayor estabilidad oxidativa y valor calorífico que los ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEEs). La tecnología de transesterificación tiene la ventaja de ser rápida, segura, fácil de controlar y ambientalmente benigna.

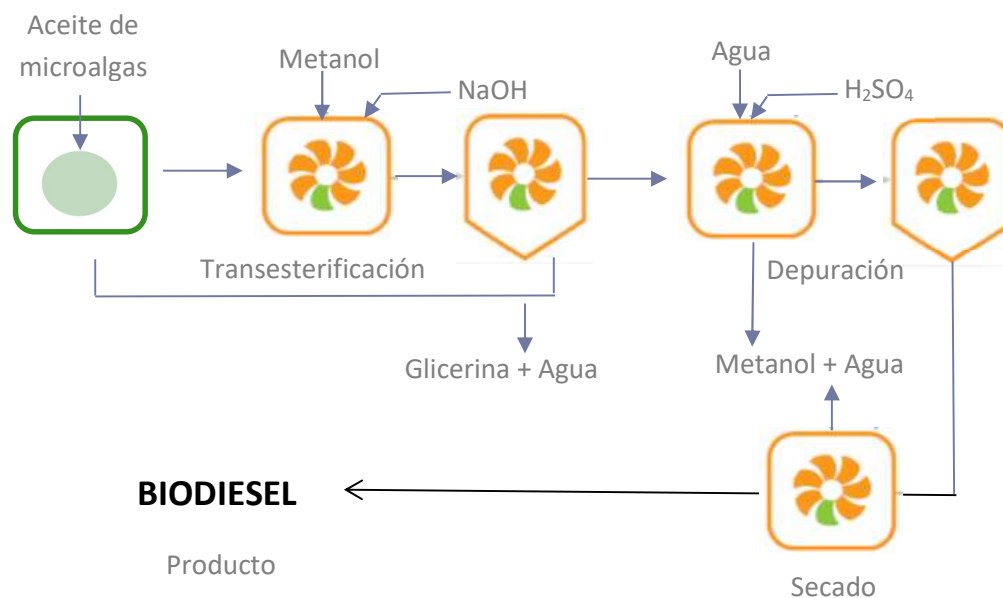


Figura 35 Esquema de la producción de biodiesel mediante transesterificación química

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación en la tabla siguiente, se muestra que en un tiempo de reacción de 2 horas los porcentajes de convesión son del 30% en con el consorcio y del 45% con *Chlorella sp.*

Tabla. Resultados de rendimiento de la reacción de transesterificación.

Muestra	Catalizador	%w/w (Cat. básico)	Alcohol	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	Rendimiento (%Conversión)
Consortio	NaOH	3.5	CH ₃ OH	2	60	30
<i>Chlorella</i> <i>sp.</i>	NaOH	7	CH ₃ OH	2	60	45

Previos estudios nos muestran que el el contenido de agua en la biomasa microalgal, representa una influencia negativa en la eficiencia de la transestificación [113]. En relación a esto, los resultados obtenidos por Liu *et al.* (2015) [113], reportan que el rendimiento de FAME obtenido de muestras con un contenido de agua del 99% presenta rendimientos del 61%.

En relación al % de conversión, López, *et al.* (2015) [114], alcanzó un porcentaje del 54.1% utilizando NaOH al 1% p/p, con una relación molar alcohol:aceite de 12:1, por lo cual, el 45% obtenido con el cultivo de *Chlorella sp.* tiene un futuro prometedor para la producción de biodiesel.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1. Se registró la presencia de 4 divisiones de microalgas en la Presa Rodrigo Gómez “La Boca”. La división más abundante fue la *Chlorophyta* (algas verdes), de la cual se aisló la microalga *Chlorella sp.*
2. Los resultados de la producción de biomasa, mediante la adición de CO₂ (0.38%) en los cultivos como única fuente de carbono, nos arrojaron que del medio MEB, BG11 y MOB se obtuvieron concentraciones de 0.082, 0.602 y 0.884 g L⁻¹ respectivamente, por lo que podemos concluir que las variaciones en la tasa de crecimiento únicamente están relacionadas a las fuentes nutrimentales utilizadas.
3. Es posible aseverar que, el uso de la longitud de onda azul es una fuente eficiente de energía para el cultivo de *Chlorella sp.* ya que incrementa el rendimiento en la generación de biomasa 8.13%.

4. La producción de biomasa de *Chlorella sp.* se incrementó 51% con relación al cultivo con medio BG11, y la remoción de P durante el cultivo fue del 100%.
5. La biomasa de *Chlorella sp.* obtenida mediante el cultivo con el medio MOB_H incrementó un 89% en concentraciones promedio de carbohidratos, lípidos y proteínas, representando una composición bioquímica ideal para el proceso de transesterificación.
6. La producción de ácidos grasos saturados y monoinsaturados (SUFAs, MUFAs), el cultivo de *Chlorella sp.* con el medio MOB indujo una disminución del 31 y 20%, respectivamente, en relación con el uso del medio BG11. El efecto contrario se observó para la concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) que aumentó un 29%.
7. Los desechos orgánicos como la orina humana inducen el crecimiento de microalgas con altas concentraciones de carbohidratos, proteínas y ácidos grasos; por consiguiente, puede proporcionar una solución valiosa para la recuperación de nutrientes de las aguas residuales y producir biomasa de alto valor para la producción de diversos productos. Es posible que el medio nutritivo MOB_H pueda reemplazar al medio BG11 en el cultivo de

microalgas, logrando procesos económicamente viables y amigables con el medio ambiente.

8. Los aceites extraídos de las microalgas *Chlorella sp.* y del consorcio, presentaron una alta concentración de ácido linoleico (C:18:1) 22.03 y 24.26% respectivamente; de modo que pueden considerarse adecuados para satisfacer dos propiedades del biodiesel estabilidad oxidativa y propiedades de baja temperatura.
9. Finalmente podemos concluir que de acuerdo con el rendimiento del 30% del biodiesel obtenido en esta investigación es posible considerar que *Chlorella sp.* y el consorcio de microalgas procedentes de la presa Rodrigo Gómez “La Boca” cultivadas bajo medio MOB_H al tener una alta concentración de ácidos grasos insaturados pueden ser considerados como materia prima para la generación de biodiesel.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BP Statistical Review of World Energy (2013). Spences Dale Group chief economist.
- [2] BP Statistical Review of World Energy (2015). Spences Dale Group chief economist.
- [3] Bailey, Ollis. (1997). Biochemical engineering fundamentals. University Princeton. McGraw-Hill. Inc.
- [4] Cerutti, M.O., Corali, F. (2011). La Bioenergía en México, Situación Actual y Perspectivas. Red Mexicana de Bioenergía, A.C.
- [5] Cardona, C.A. (2009). Perspectives of Biofuels Production in Colombia. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Sede Manizales, Colombia.
- [6] International Energy Agency (AIE). año
- [7] Di Paola, M.M. (2013). La Producción de Biocombustibles en Argentina. Informe Ambiental Anual. FARN.
- [8] Perspectivas de Energías Renovables 2012-2026. SENER. Citar bien
- [9] Urias, R.E., Meza, E., Mendoza, J.M. (2014). Los Biocombustibles en América Latina. Actualidad y debates según las experiencias en Brasil, Argentina y México. Observatorio de la Economía Latina. 201.

- [10] Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 88(10):3402–3410.
- [11] Chisti, Y. (2011). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26(3):126-131.
- [12] Ganduglia, F., León, J.G., Gasparini, R., Rodríguez, M.E. (2009) Manual de Biocombustibles. Asociación Regional de Empresas de Petróleo y Gas Natural en Latinoamérica y el Caribe y El Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- [13] Chen, H., Zhou, D., Luo, G., Zhang, S., Chen, J. (2014). Microalgae for biofuels production: Progress and perspective. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 47: 427-437.
- [14] Machado, C.M. (2010). Situación de los Biocombustibles de 2^{da}. Y 3^{era} Generación en América Latina y El Caribe. Organización Latinoamericana de Energía (OLADE) y El Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- [15] Amaro, H.M., Guedes, A.C., Malcata, F.X. (2011). Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel. *Applied Energy*. 88(10):3402–3410.
- [16] Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. 25(3):294-306.
- [17] Demirbas, A. (2009). Political, economic, and environmental impacts of biofuels. *A review*. 86:108-117.
- [18] Palomino, M.A., Estrada, F.C., López, G.J. (2010). Microalgas potencial para la producción de biodiesel. Universidad del Valle, Cali, Colombia.
- [19] Abalde, J., Cid, A., Fidalgo, J.P., Torres, E., Herrero, C. (1995). Microalgas: Cultivo y Aplicación. Laboratorio de Microbiología. Facultad de Ciencias. Universidad Coruña. 210.

- [20] Lau, P., Tam, N., Wong, Y. (1995). Effect of algal density on nutrient removal from primary settled wastewater. *Environmental Pollution*. 89(1):59-66.
- [21] Tam, N.F., Wong, J.P., Wong, Y.S. (2001). Repeated use of two *Chlorella* species, *C. Vulgaris* and ww1 for cyclic nickel bioadsorption. *Environmental pollution*. 114(1):85-92.
- [22] Borowitzka, M.A. (1988). Algal growth media and sources of cultures. In: Borowitzka M.A. & Borowitzka L.J. (eds.), *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press: Cambridge. 456-465.
- [23] Borowitzka, M.A. (1988). Microalgae as sources of essential fatty acids. *Australian Journal of Biotechnology*. 1:58-62.
- [24] Trivedi, J., Aila, M., Bangwal, D.P., Kaul, S., Grag, M.O. (2014). Algae based biorefinery-How to make sense? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 47:295-307.
- [25] Dreckmann, K. M., Sentíes, A., Núñez, M. L. (2013). *Manual de prácticas de laboratorio. Biología de algas*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa.
- [26] Santaella., Álvarez, E. (2013). *Producción y desarrollo de cultivo de algas para la captación de anhídrido carbónico y la producción de biocombustibles*. Instituto Nacional de Oceanografía, Madrid.
- [27] Chisti, Y. (2011). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*. 26(3):126-131.
- [28] Madigan, M.T, Martinko J.M., Parker J (2004). *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Editorial Pearson/Prentice Hall.
- [29] Bojorge-García, M., Cantoral, E. (2016). La importancia de las algas en los ríos. *Hidrobiológica*. 26(1):1-8.

- [30] Breman, L., Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae a review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew. sust. Energ.* 14(2):557-577.
- [31] Mutanda, T., Bux, F., Ramesh, D., Karthikeyan, S., Kumari, S., Anandra, J. A. (2010) Bioprospecting for hyper-lipid producing microalgal strains for sustainable biofuel production. *Bioresource Techn.* 102(1):57–70.
- [32] Fernández, L.I., Montiel, M.J., Millán, O.A., Badillo, C.A. (2012). Producción de Biodiesel a partir de microalgas. *Revista Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable.* 8(3): 101-115.
- [33] Demirbas, A. (2010). Energy Sources Part A. *Recovery Utilization en Environmental Effects.* 32(10):909-910.
- [34] Lee JY, Yoo C, Jun SY, Ahn CY, Oh HM. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresour Technol.* 2010 Jan;101 Suppl 1:S75-7
- [35] Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W., Posewitz, M.C. (2009). Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. *Energy Biotechn.* 20(3):264-271.
- [36] Stephanopoulos, G., Fischer, C.R., Klein-Marcuschamer, D. (2008). Selection, and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metabolic Engineering.* 10(6):295–304.
- [37] Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M., Posewitz, M., Seibert, M., Darzins, A. (2008). Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant Journal.* 54:621-639.
- [38] Harwood, J.L., Guschina, I.A. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research.* 45(2):160–186.

- [39] Scott, S.A., Davey, M.P., Dennis, J.S., Horst, I. (2010). Biodiesel from algae: challenges and prospects. *Current Opinion in Biotechnology*. 2(3):277-286.
- [40] Rajakumari, S., Grillitsch, K., Daum, G. (2008). Synthesis, and turnover of non-polar lipids in yeast. *Progress in Lipid Research*.47(3):157-171.
- [41] Murphy, D.J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*.40:325-438.
- [42] Ohlrogge, J., Browse J. (1995). Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. 7(7):957-70.
- [43] Canakci, M., Sanli, H. (2008). Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. *J Ind Microbiol Biotechnol*.35(5):431-441.
- [44] Khan, S.A., Hussain, M. Z., Prasad, S., Banerjee, U.C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*.13(9):2361-2372.
- [45] Yen, H.W., Hu, I.C., Chen, C.Y., Ho, S.H., Lee, D.J., Chang, J.S. (2013) Microalgae-based biorefinery—from biofuels to natural products. *Bioresour Technol*. 135:166–174.
- [46] Lee, A.K., Lewis, D.M., Ashman, P.J. (2014). Microalgal cell disruption by hydrodynamic cavitation for the production of biofuels. *Journal of Applied Phycology*. 27:1881-1889.
- [47] Cirik, K., Dursun, N., Ahinkaya, E., Çınar, Ö. (2013). Effect of electron donor source on the treatment of Cr (VI)-containing textile wastewater using sulfate reducing fluidized bed reactors (FBRs), *Bioresour. Technol*. 133:414-420.
- [48] Lee, I., Han, J.I. (2015). Simultaneous treatment (cell disruption and lipid extraction) of wet microalgae using hydrodynamic cavitation for enhancing the lipid yield. *Bioresour Technol*.186:246-251.

- [49] Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C.W., Park, M.S., Yang, J.W. (2013). Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv.* 31(6):862-876.
- [50] García-Gozalbes, C.C., Arbib, Z., Perales-Vargas-Machuca, J.A. (2015) Cinéticas de crecimiento y consume de nutrientes de microalgas en aguas residuales urbanas con diferentes niveles de tratamiento. *Tecnología y Ciencias del Agua.* VI1:49-68.
- [51] López, J.A., Báez, D., Huerta, A. (1995). Manual de técnicas analíticas aplicadas al cultivo de microalgas. Publicaciones Académicas CICTUS. 5:47
- [52] Protocolo de microalgas. Centro Regional de Investigación Pesquera (CRIP) Manzanillo, Colima.
- [53] Lopes, J., Gimenes, C., Ferreira, L. (2009). Effect of light cycles (night/day) on CO₂fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and processing.* 48(1):306-310.
- [54] Yuan-Kun, L., Hui, S. (2004). Basic culturing techniques. Handbook of Microalgal Culture (Biotechnology and Applied Phycology). Edited by Amos Richmond. Blackwell Publishing: 40-56.
- [55] Celis-García L.B., Razo-Flores, E., Monroy, O. (2007). Performance of a downflow fluidized-bed reactor under sulfate reduction conditions using volatile fatty acids as electron donors. *Biotechnol. Bioeng.* 97(4):771-779.
- [56] Malaviya, P. Singh, A. (2016). Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Crit Rev Microbiol.* 42(4):606-633.
- [57] Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A., Ibraheem, IBM. (2012). Microalgae and wastewater treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences.* 19:257-275.
- [58] Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol.* 65:635-48.

- [59] Ganesan, D., Rajendran, A., Thangavelu, V. (2009). An overview on there cent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. *Rev Environ Sc Biotechnol*. 8:367-394.
- [60] Chen, C.Y., Yeh, K.L., Aisyah, R., Lee, D.J., Chang, J.S. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol*. 102(1):71-81.
- [61] Rawat, I., Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88(10):3411-3424
- [62] Park, J., Craggs, R., Shilton, A. (2011). Recycling algae to improve species control and harvest efficiency from a high rate algal pond. *Water Res*. 45(20):6637-6649.
- [63] Nelsen, S. (1998). Food Analysis Second Edition; An Aspen Publication, Gaithersburg, Maryland.
- [64] Harper, H.A., Rodwell., V.W., Mayes, P.A. (1979) Review of physiological chemistry. 17th ed. Lange Medical Publications. 39: The kidney and the urine; 702.
- [65] Bungartz, F., Nash, III. (2003). Claves para la identificación de los géneros de fotobiontes. Consejería de Medio Ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura del Principado de Asturias y KRK ediciones.
- [66] Pirt, S.J., Lee, Y.K., Walach, M.R., Pirt, M.W., Balyuzi, H.H., Bazin, M.J. (1983). A tubular bioreactor for photosynthetic production of biomass from carbon dioxide: design and performance. *J. Chem. Tech. Biotechnol*. 33(1):35-58.
- [67] Yu, W., Ansari, W., Schoepp, N., Hannon, M., Mayfield, S., Burkart, M. (2011). Modifications of the metabolic pathways of lipid and triacylglycerol production in microalgae. *Microbial Cell Factories*. 10:91.

- [68] Pearson, D. (1993). Técnicas de laboratorio para el análisis de alimentos. Acribia, S.A. Zaragoza (España).
- [69] Cai, T., Park, S.Y. (2013). Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: status and prospects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 19:360-369.
- [70] Markou, G. Angelidak, I. Georgakakis, D. (2012). Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiol Biotechnol*. 96(3):631-45
- [71] Rawat, I., Ranjith-Kumar, R., Mutanda, T., Bux, F. (2011). Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. *Applied Energy*. 88:3411-3424
- [72] Cardoso-Ugarte, G., Juárez-Becerra, G., Sosa-Morales., López-Malo, M.A. (2013). Microwave-assisted extraction of essential oils from herbs. *Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy*. 47:1.
- [73] Juárez, G. (2011). Extracción asistida con microondas y arrastre de vapor de aceite esencial de epazote (*Chenopodium ambrosoides*) y su evaluación como agente antifúngico. Tesis de maestría. Universidad de las Américas Puebla. México.
- [74] Nollet., Leo, M.L. (1996). Handbook of food analysis; M. Dekker, New York.
- [75] Lv, J., Wu, H., Chen, M. (2011). Effects of nitrogen and phosphorus on phytoplankton composition and biomass in 15 subtropical, urban shallow lakes in Wuhan, China. *Limnologica*. 41:48-56.
- [76] Dayton, P. K. (1971). Competition, disturbance, and community organization: The provision and subsequent utilization of space in a rocky intertidal community. *Ecological Monographs*. 41(4):351-389.
- [77] Paine, R.T., Levin, S.A. (1981). Intertidal landscapes: Disturbance and the dynamics of pattern. *Ecological Monographs*. 51(2):145-178.

- [78] Roughgarden, J. (1983). Competition and theory in community ecology. *The American Naturalist*. 122(5):583-601.
- [79] Peñaranda, M.T.A., Roldán, A.D.J.M., Villanueva, R.O.C. (2013). Producción de biodiesel a partir de microalgas: parámetros del cultivo que afectan la producción de lípidos. *Acta Biológica Colombiana*. 18:43-68.
- [80] Batista, A.P., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Franco, J.M., Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research*. 2(2):164-173.
- [81] Steinbrenner, J. Linden, H. (2001). Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology*. 125(2):810-817.
- [82] Del Río, E., Acien, G., Garcia-Malea, G., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M.G. (2007). Efficiency assessment of the one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*. 74:397-402.
- [83] Martin, F.P.H. (2010). Optimization of photobioreactor for astaxanthin production in *Chlorella zofingiensis*. Tesis de Maestría en Ingeniería. National University of Singapore.
- [84] Alyabyev, A., Andreyeva, I., Rachimova, G. (2011). Influence of pH shift and salting on the energetics of microalgae *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella maritima*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 104:201–207.
- [85] Dan, Telah, D., Sintov, A., Cohen, E. (2004). The effect of salt stress on the production of canthaxanthin and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis* grown under limited light intensity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 20(5):483–486.

- [86] García-Malea, M.C., Acién, F.G., Fernández, J.M., Cerón, M.C., Molina, E. (2006). Continuous production of green cells of *Haematococcus pluvialis*: Modeling of the irradiance effect. *Enzyme and Microbial Technology*. 38(7):981–989.
- [87] Fábregas, J., Domínguez, A., Álvarez, D.C., Lamela, T., Otero, A. (1998) Induction of astaxanthin accumulation by nitrogen and magnesium deficiencies in *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnol Lett*. 20:623–626
- [88] Sánchez, R.M., Castro-González, M., Zea, S. (2011). Efecto del enriquecimiento por nitrógeno y fósforo en los cambios netos de nutrientes y producción fitoplanctónica en la desembocadura del río Sevilla, Ciénaga Grande de Santa Marta. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*. 35:134; 35-43.
- [89] Brenfang, P.K., Takahashi, M. (1983). Ultra-plankton growth rates in a subtropical ecosystem. *Mar. Biol*. 76: 213-218.
- [90] Smith, V.H., Samantha, B., Joye, S.B., Howarth, R.W. (2006). Eutrophication of freshwater and marine ecosystems. *Limnology & Oceanography*. 51(1):351-355.
- [91] Fasahati, P., Woo, H.C., Liu, J. (2015). Industrial-scale bioethanol production from brown algae: effects of pretreatment. *Applied Energy Elsevier*. 139(C):175–187
- [92] Ono, E., Cuello J.L. (2003). Selection of optimal species for CO₂ sequestration. In: Second Annual Conference on Carbon Sequestration, Alexandria, Virginia, USA, May 5–8.
- [93] Plasencia, J. (2012). Cultivo de microalgas (*Chlorella sorokiniana*) con iluminación mediante LEDs (Light Emitting Diodes). Universidad Politécnica de Madrid.
- [94] Benavente-Valdés, B., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J.C., Méndez-Zavala, A., Montañez, J. (2016). Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species. *Biotechnology Reports*. 10(C):117-125.
- [95] Mooij, P.R., Stouten, G.R., Van, Loosdrecht, M.C., Kleerebezem, R. (2015) Ecology-based selective environments as solution to contamination in microalgal cultivation. *Curr Opin Biotechnol* 33:46–51.

- [96] Hosseini, N.S., Shang, H., Ross, G.M., Scott, J.A. (2015). Microalgae cultivation in a novel top light open bioreactor. *Bioresour Technol.* 192:432-440.
- [97] Azcón-Bieto, J., Talón, M. (2008). Fundamentos de fisiología vegetal. Segunda Edición ed. Barcelona: McGRAW-HILL.
- [98] Araya, K., Ugarte, A., Azócar, L., Valerio, O., Wick, L.Y., Ciudad, G. (2015). Whole cell three phase bioreactors allow for effective production fatty acid alkyl esters derived from microalgae lipids. *Fuel*.144:25-32.
- [99] Morris, H., Quintana, M., Almarales, A., Hernández, L. (1996). Composición bioquímica y evaluación de la calidad proteica de la biomasa autotrófica de *Chlorella vulgaris*. *Revista cubana de alimentación y nutrición*. 13(2):123-128.
- [100] Andrade, R., Torres, R., Montes, E., Fernández, A. (2007). Obtención de harina a partir del cultivo de *Chlorella vulgaris* y su análisis proteico. *Temas Agrarios*.12(1):50-57.
- [101] Coppens, J., Lindeboom, R., Muys, M., Coessens, W., Alloul, A., Meerbergen, K., Lievens, B., Clauwaert, P., Boon, N. and Vlaeminck, S.E. (2016). Nitrification and microalgae cultivation for two-stage biological nutrient valorization from source separated urine. *Bioresour Technol.* 211:41-50.
- [102] Feng, D-L., Wu, Z-Ch. (2006). Culture of *Spirulina platensis* in human urine for biomass production and O₂ evolution. *Journal of Zhejiang University Science B* 7(1):34-37.
- [103] Becker, E.W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances* 25:207-210.
- [104] Mutlu, Y.B., Isik, L., Uslu, K., Koc., Durmaz, Y. (2011). The effects of nitrogen and phosphorus deficiencies and nitrite addition on the lipid content of *Chlorella vulgaris* (*Chlorophyceae*). *African Journal of Biotechnology* 10:453-456.
- [105] Mercer, P., Armenta, R. E. (2011). Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113:539-547.

- [106] Darki, B.Z., Seyfabadi, J., Fayazi, S. (2017). Effect of nutrients on total lipid content and fatty acids profile of *Scenedesmus obliquus*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 60, 1-12.
- [107] Bellou, S., Triantaphyllidou, I.-E., Aggel, D., Elazzazy, A.M., Baeshen, M.N. Aggelis G. (2016). Microbial oils as food additives: recent approaches for improving microbial oil production and its polyunsaturated fatty acid content. *Current Opinion in Biotechnology* 37:24-35.
- [108] Rohit, M.V., Venkata, S. (2018). Quantum Yield and Fatty Acid Profile Variations with Nutritional Mode During Microalgae Cultivation. *Frontier in Bioengineering and Biotechnology* 6:111.
- [109] Xue, L., Wang, L., Zhang, L., Balamurugan, S., Li, D., Zeng, H., Yang, D., Liu, S., Li, Y. (2016). The pivotal role of malic enzyme in enhancing oil accumulation in green microalga *Chlorella pyrenoidosa*. *Microb Cell Fact.* 15(1):120.
- [110] Ehimen, E.A., Sun, Z.F., Carrington, C.G. (2010). Variables affecting the in situ transesterification of microalgae lipids. *Fuel.* 89:677-684.
- [111] Ríos SD, Castañeda J, Torras C, Farriol X, Salvadó J. (2013). Lipid extraction methods from microalgal biomass harvested by two different paths: screening studies toward biodiesel production. *Bioresour Technol.* 133:378-388.
- [112] Huang, J., Xia, J., Jiang, W., Li, Y., Li, J. (2015). Biodiesel production from microalgae oil catalyzed by a recombinant lipase. *Bioresour Technol.* 180:47–53.
- [113] Lui, J., Lui, Y., Wang, H., Xue, S. (2015). Direct transesterification of fresh microalgal cells. *Bioresour Technol.* 176:284-287.
- [114] López, L., Bocanegra, J., Malagón-Romero, D. (2015). Obtención de biodiesel por transesterificación de aceite de cocina usado. *Ingeniería y Universidad.* 19(1):7-24.